



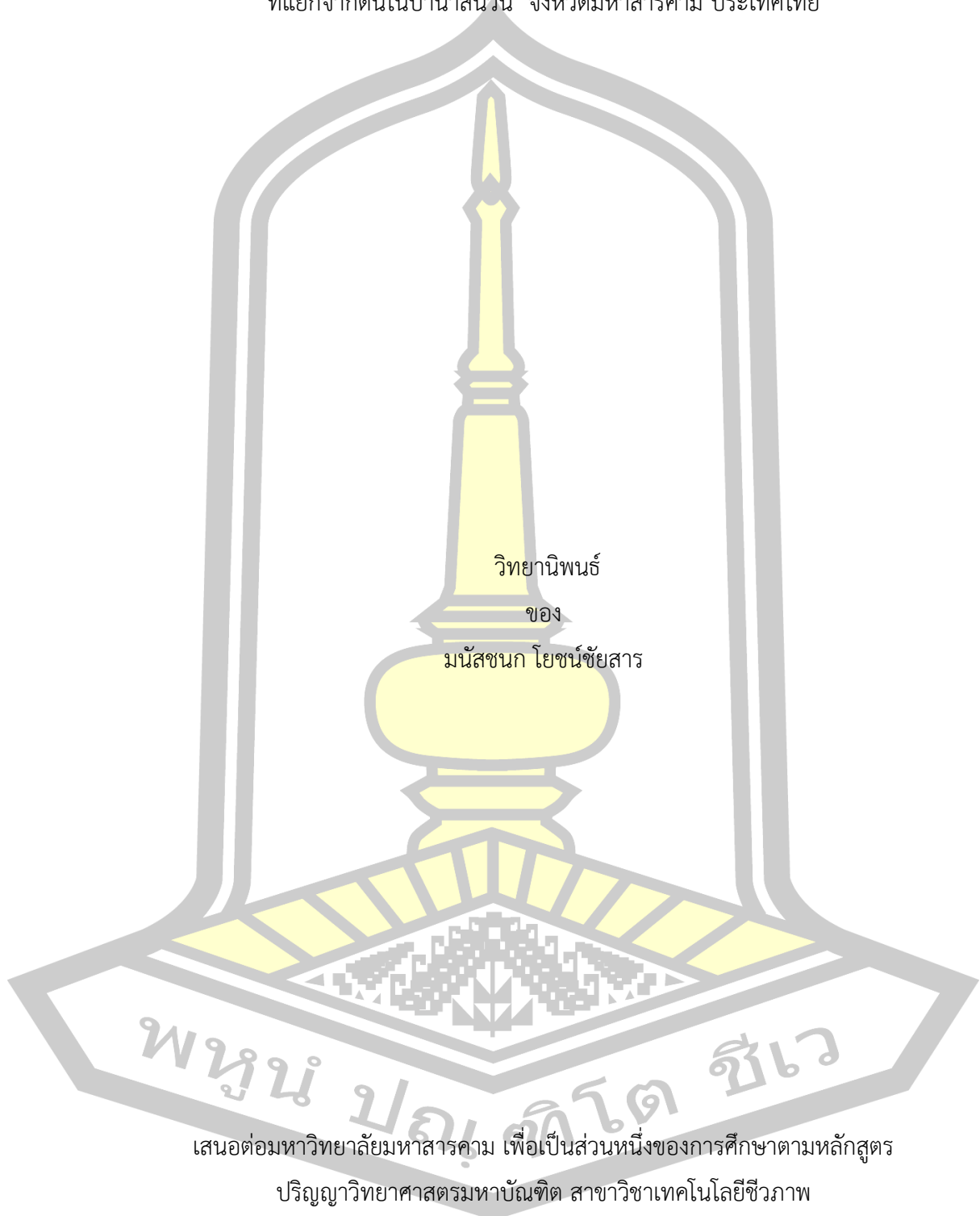
การคัดเลือกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลติก
ที่แยกจากดินในป่านาสีนวน จังหวัดมหาสารคาม ประเทศไทย

วิทยานิพนธ์
ของ
มนัสชนก โยชน์ชัยสาร

เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ตุลาคม 2562

สงวนลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

การคัดเลือกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลติก
ที่แยกจากดินในป่านาสีนวน จังหวัดมหาสารคาม ประเทศไทย

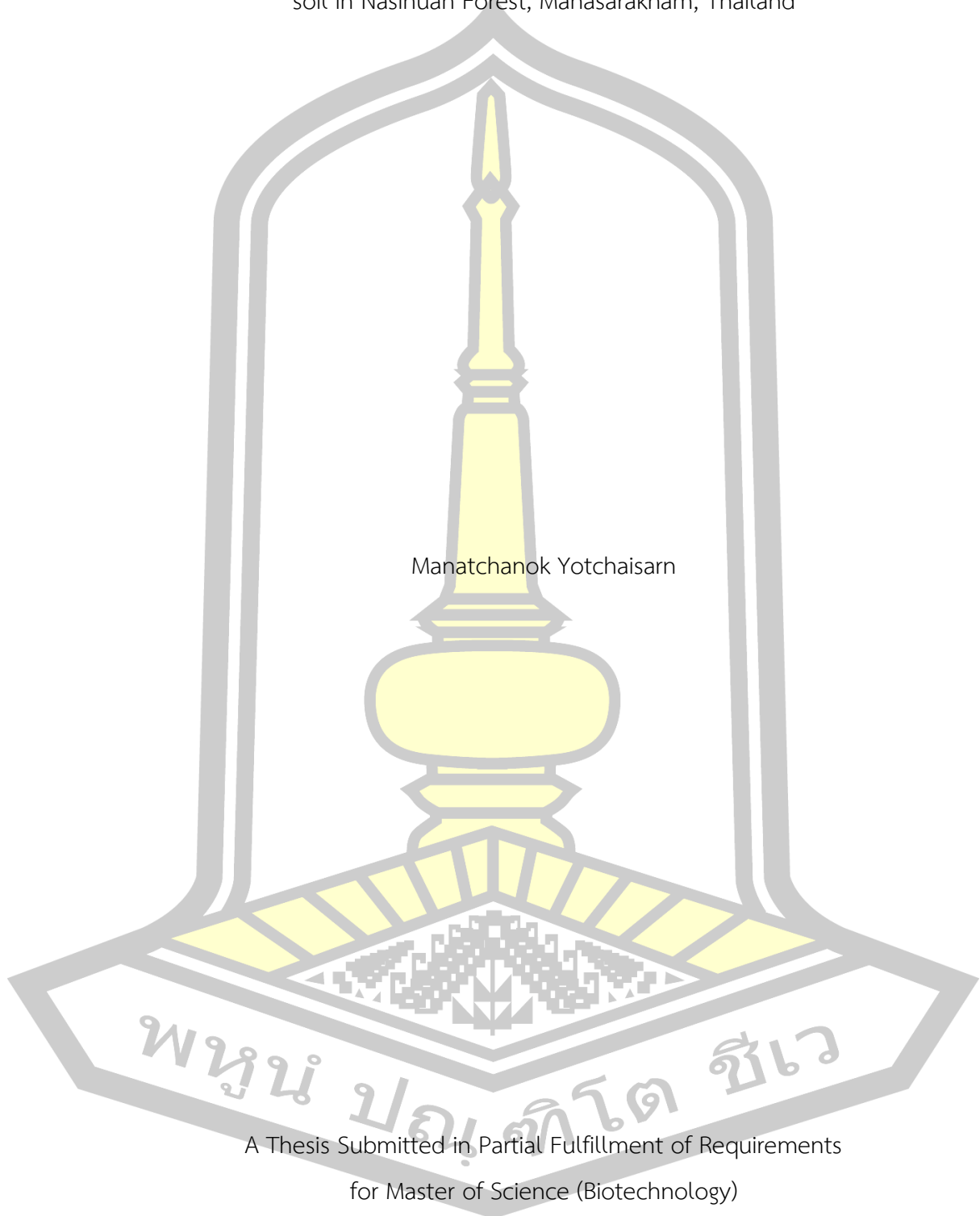


เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ตุลาคม 2562

สงวนลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

Screening and identification of hydrolytic enzyme producing bacteria isolated from
soil in Nasinuan Forest, Mahasarakham, Thailand



Manatchanok Yotchaisarn

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements
for Master of Science (Biotechnology)

October 2019

Copyright of Mahasarakham University



คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของนางสาวมนัสชนก โยชน์ชัย
สาร แล้วเห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ประธานกรรมการ

(ผศ. ดร. ปรียกมล กลั่นฤทธิ์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผศ. ดร. วิจิตรา หลวงอินทร์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผศ. ดร. ศิริรัตน์ ดีศีลธรรม)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผศ. ดร. เกศสุคนธ์ มณีวรรณ)

กรรมการ

(ผศ. ดร. ลือชัย บุตคุป)

กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก

(ผศ. ดร. จีรวรรณ อภิรักษากร)

มหาวิทยาลัยอนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญา วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

(รศ. ดร. อนุชิตา มุ่งงาม)

คณบดีคณะเทคโนโลยี

(ผศ. ดร. กริสน์ ชัยมูล)

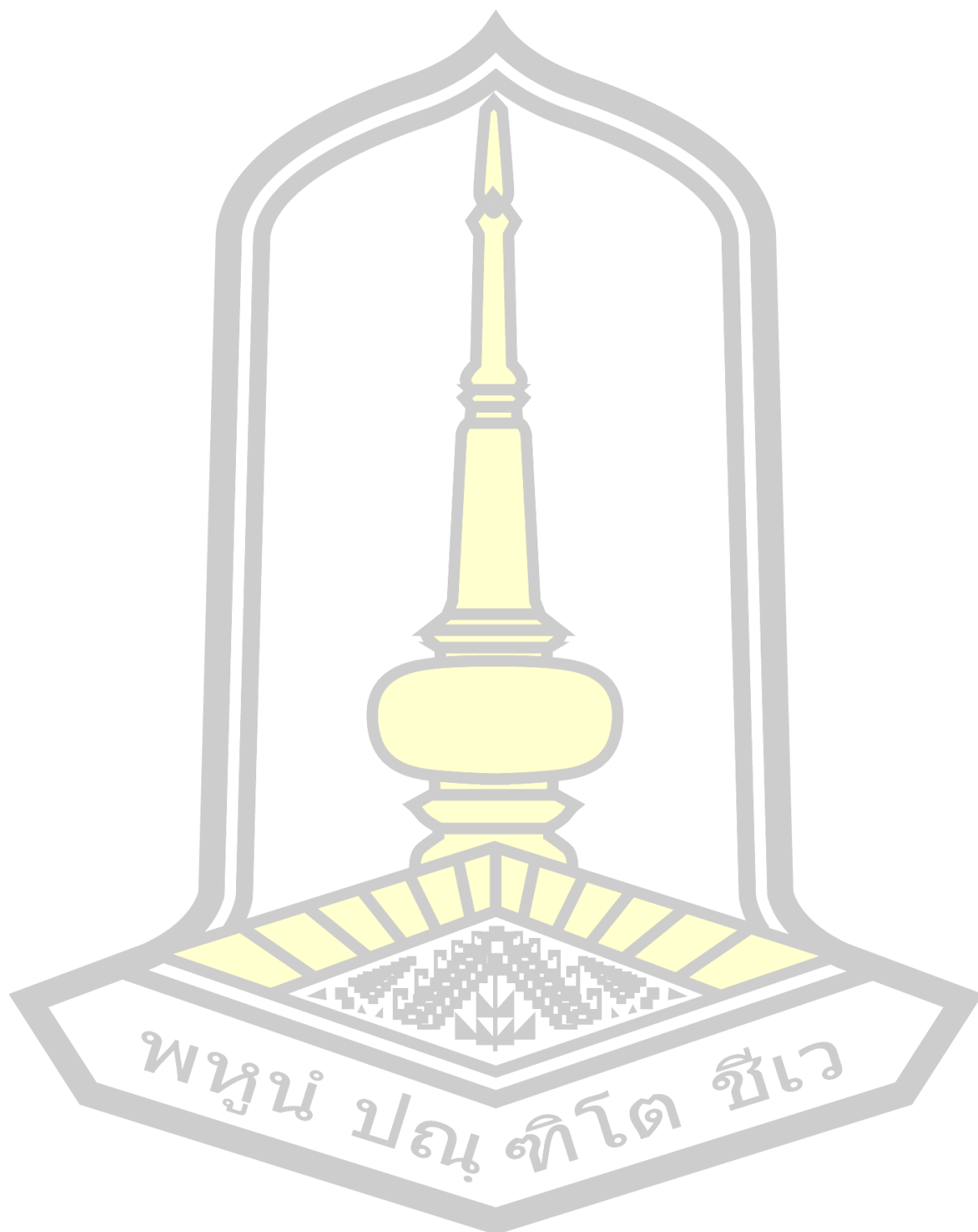
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง	การคัดเลือกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลติกที่แยกจากดินในป่านาสีนวน จังหวัดมหาสารคาม ประเทศไทย		
ผู้วิจัย	มนัสชนก โยชนชัยสาร		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิจิตรา หลวงอินทร์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ ดีศีลธรรม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เกศสุคนธ์ มณีวรรณ		
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
มหาวิทยาลัย	มหาวิทยาลัยมหาสารคาม	ปีที่พิมพ์	2562

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาเกี่ยวกับการคัดเลือกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลติกที่แยกจากดินในป่านาสีนวน จังหวัดมหาสารคาม ประเทศไทย ผลวิจัยพบแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลติกจำนวน 115 ไอโซเลท ได้แก่ แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส 7 ไอโซเลท เอนไซม์อะไมเลส 32 ไอโซเลท เอนไซม์โปรตีเอส 41 ไอโซเลท และเอนไซม์ไลเปส 35 ไอโซเลท ตามลำดับ ผลการคัดเลือก จำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียด้วยเทคนิคยีน 16S rRNA และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลติกสูงที่สุดจากค่า Halo : colony ratios พบว่า *Bacillus subtilis* 1.2CL2 มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุดเท่ากับ 5.54 ± 0.00 ยูนิท/มิลลิลิตร หลังบ่มในสภาวะที่เหมาะสมอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส pH 6 นาน 30 นาที *Bacillus cereus* 3.5AL3 มีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูงที่สุดเท่ากับ 47.15 ± 0.82 ยูนิท/มิลลิลิตร หลังบ่มในสภาวะที่เหมาะสมอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส pH 7 นาน 30 นาที *Bacillus subtilis* 2.3PT3 มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสสูงที่สุดเท่ากับ 8.86 ± 0.26 ยูนิท/มิลลิลิตร หลังบ่มในสภาวะที่เหมาะสมอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส pH 8 นาน 30 นาที และ *Bacillus subtilis* 1.3LP2 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุดเท่ากับ 160.92 ± 0.91 ยูนิท/มิลลิลิตร หลังบ่มในสภาวะที่เหมาะสมอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส pH 7 นาน 30 นาที ตามลำดับ งานวิจัยนี้เป็นรายงานครั้งแรกของการคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลติกในพื้นที่ป่านาสีนวน จังหวัดมหาสารคาม ประเทศไทย แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เหล่านี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ทางอุตสาหกรรมที่หลากหลาย ได้แก่ อุตสาหกรรมอาหาร เครื่องดื่ม ผงซักฟอก ผลิตไบโอดีเซล อุตสาหกรรมกระดาษ เป็นต้น และสามารถนำไปเพิ่มมูลค่าให้แก่อุตสาหกรรมเอนไซม์ในประเทศไทย

คำสำคัญ : เซลลูเลส, อะไมเลส, โปรตีเอส, ไลเปส, ดิน, อุตสาหกรรม



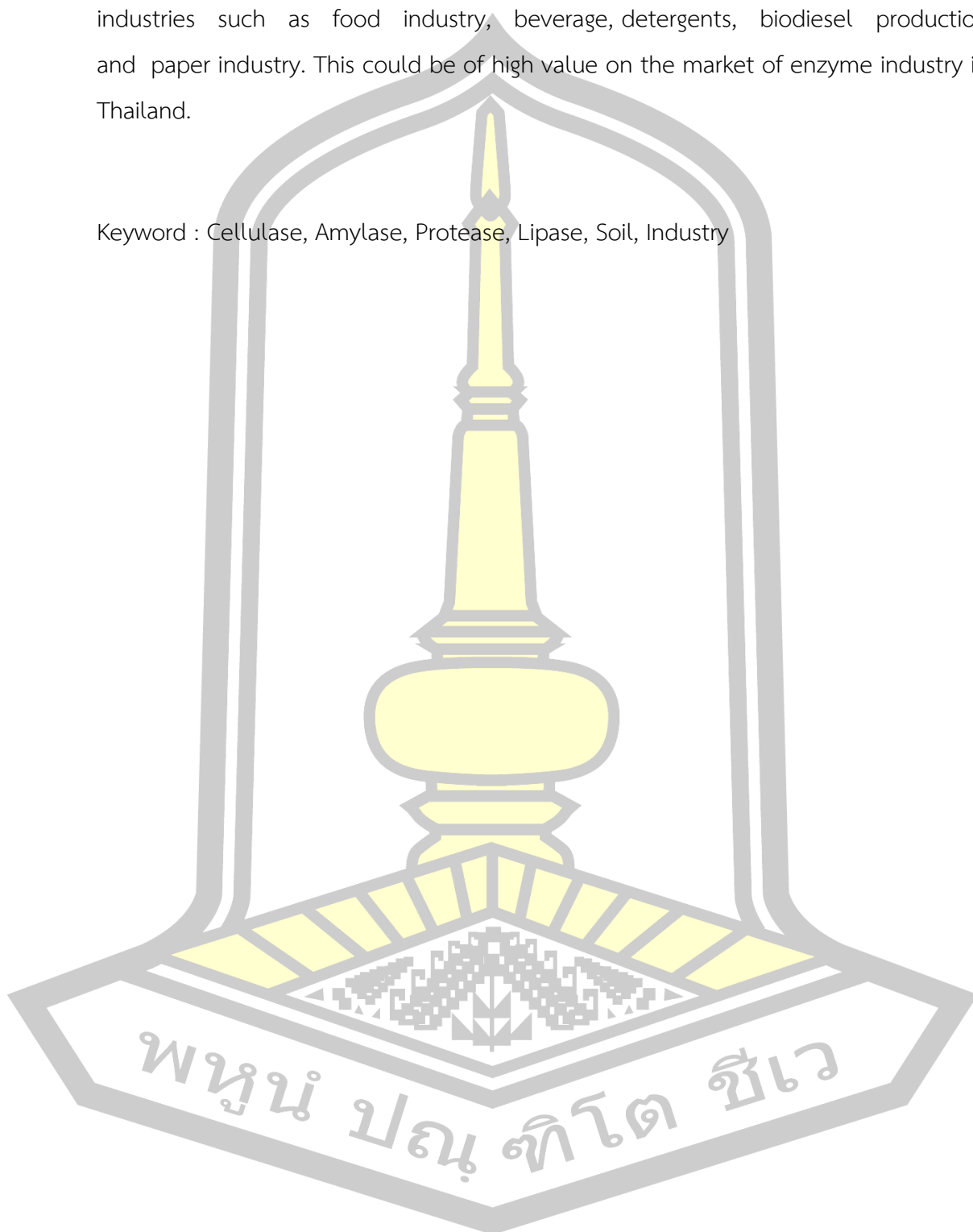
TITLE	Screening and identification of hydrolytic enzyme producing bacteria isolated from soil in Nasinuan Forest, Mahasarakham, Thailand		
AUTHOR	Manatchanok Yotchaisarn		
ADVISORS	Assistant Professor Vjitra Luangin , Ph.D. Assistant Professor Sirirat Deeseenthum , Ph.D. Assistant Professor Kedsukon Maneewun , Ph.D.		
DEGREE	Master of Science	MAJOR	Biotechnology
UNIVERSITY	Mahasarakham University	YEAR	2019

ABSTRACT

In this study, hydrolytic enzyme producing bacteria isolated from soil in Nasinuan Forest, Mahasarakham, Thailand were screened for and identified. A total of 115 bacterial isolates were found to produce either cellulase 7 isolates, amylase 32 isolates, protease 41 isolates or lipase 35 isolates, respectively. Selection of bacterial strains was identified by using the 16S rRNA gene technique and the optimum conditions for bacteria that produce with highest hydrolytic enzyme from Halo: colony ratios were evaluated. Our results indicated that *Bacillus subtilis* 1.2CL2 was exhibited cellulase activity of 5.54 ± 0.00 U/mL and the optimum conditions for cellulase activity was at 35 °C and pH 6 after incubation for 30 min. The result indicated that *Bacillus cereus* 3.5AL3 was exhibited amylase activity of 47.15 ± 0.82 U/mL and the optimum conditions for amylase activity was at 65 °C and pH 7 after incubation for 30 min. The result indicated that *Bacillus subtilis* 2.3PT3 was exhibited protease activity of 8.86 ± 0.26 U/mL and the optimum conditions for protease activity was at 65 °C and pH 8 after incubation for 30 min. And our result indicated that *Bacillus subtilis* 1.3LP2 was exhibited lipase activity of 160.92 ± 0.91 U/mL and and the optimum conditions for lipase activity was at 55 °C and pH 7 after incubation for 30 min, respectively. This is the first report of bacteria producing hydrolytic enzymes in Nasinuan forest,

Maharakham, Thailand. These bacterial enzymes can be applied in various industries such as food industry, beverage, detergents, biodiesel production and paper industry. This could be of high value on the market of enzyme industry in Thailand.

Keyword : Cellulase, Amylase, Protease, Lipase, Soil, Industry



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความรู้และความช่วยเหลืออย่างสูงยิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิจิตรา หลวงอินทร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ ดีศีลธรรม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เกศสุคนธ์ มณีวรรณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ลือชัย บุตคุป ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปรียกมล กลั่นฤทธิ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิรวรรณ อภีรักษากร กรรมการคุมสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและคำปรึกษาในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ให้สำเร็จ ล่วงไปได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่มอบทุนอุดหนุนการทำกิจกรรม ส่งเสริมและสนับสนุนการวิจัยประเภททุนบัณฑิตศึกษา ประจำปี 2561

ขอขอบพระคุณหน่วยงานวิจัยนวัตกรรมสารต้านอนุมูลอิสระทางธรรมชาติและเจ้าหน้าที่ ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม และศูนย์ เครื่องมือกลาง กองส่งเสริมการวิจัยและบริการวิชาการ ที่ให้คำแนะนำและอนุเคราะห์สถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องมือในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณเพื่อนๆ ระดับบัณฑิตศึกษาทุกท่านที่คอยให้ความช่วยเหลือ และคอยเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา

ท้ายสุดนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา ที่สนับสนุนทุนทรัพย์ให้โอกาสทางการศึกษา อบรมสั่งสอนและเป็นกำลังใจที่สำคัญที่ดีตลอดมา

มนัสชนก โยชนชัยสาร

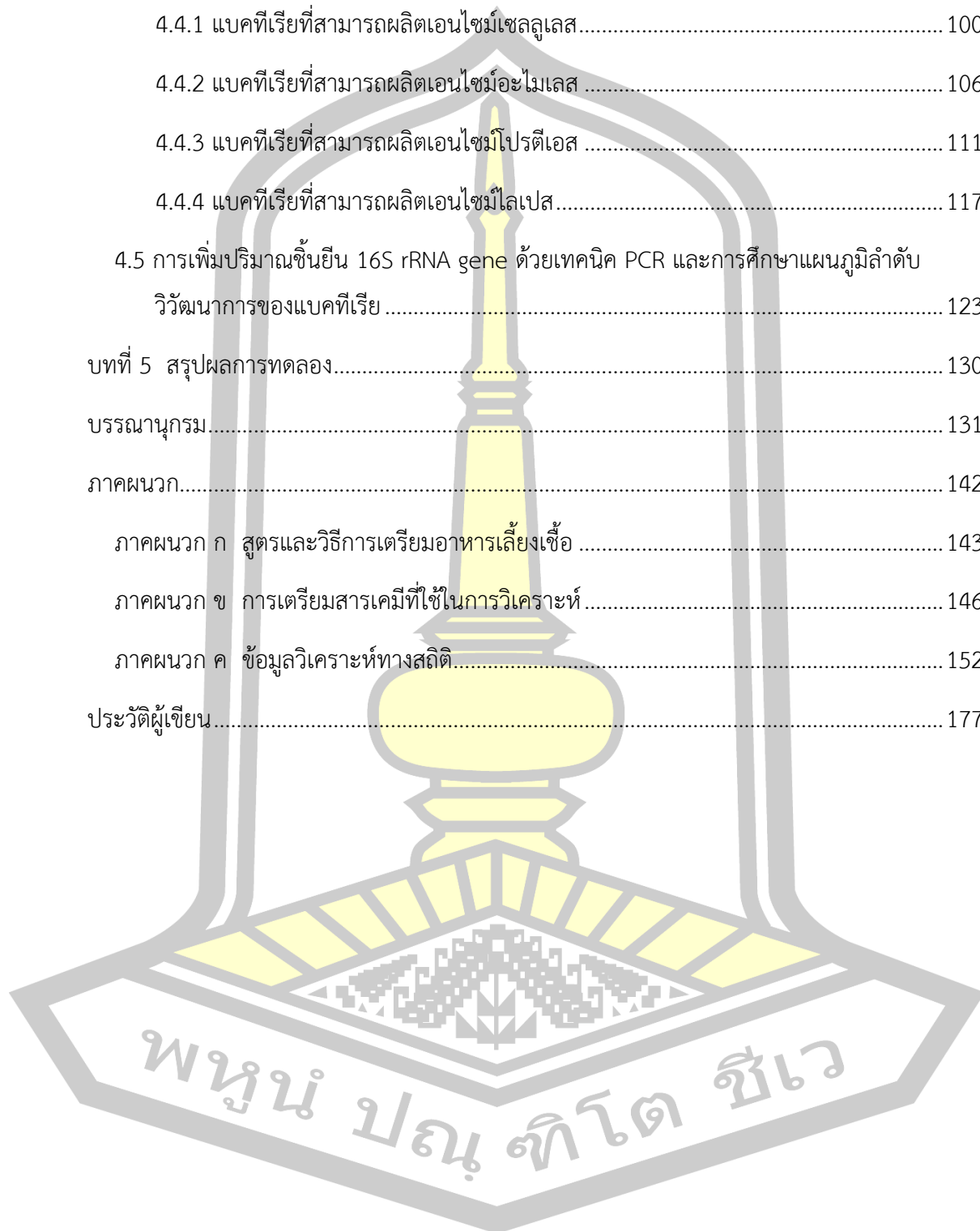
พูน ปณ ทิโต ชีเว

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ฉ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ.....	ฌ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูปภาพ.....	๗
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
1.4 กรอบความคิดของงานวิจัย.....	3
1.5 แผนการดำเนินงานวิจัย.....	4
บทที่ 2 ทบทวนเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 แבקที่เรียในดิน.....	5
2.2 เอนไซม์ไฮโดรไลติกที่ได้จากแบคทีเรีย.....	6
2.2.1 เอนไซม์เซลลูเลส.....	6
2.2.2 เอนไซม์อะไมเลส.....	9
2.2.3 เอนไซม์โปรตีเอส.....	11
2.2.4 เอนไซม์ไลเปส.....	12
2.3 แหล่งของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในทางอุตสาหกรรม.....	14
2.4 บทบาทของเอนไซม์ทางอุตสาหกรรมในปัจจุบัน.....	22

2.5 การศึกษาความหลากหลายทางสายพันธุ์ของแบคทีเรียด้วยเทคนิคซีวียาระดับโมเลกุล....	22
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	24
3.1 สถานที่เก็บข้อมูล	24
3.2 การเก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ดินเค็ม	24
3.3 การแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์สำคัญทางอุตสาหกรรม	25
3.3.1 เอนไซม์เซลลูเลส	25
3.3.2 เอนไซม์อะไมเลส	27
3.3.3 เอนไซม์โปรตีเอส	28
3.3.4 เอนไซม์ไลเปส.....	30
3.4 การจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียโดยวิธี PCR-based 16S rRNA gene	31
3.5 การหาปริมาณของโปรตีนและการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์	32
3.5.1 การเตรียม extracellular crude enzyme	32
3.5.2 การหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry's method	33
3.5.3 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์	33
3.6 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์	33
3.6.1 หา pH ที่เหมาะสม	33
3.6.2 หาอุณหภูมิที่เหมาะสม	33
3.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ	34
บทที่ 4 ผลการทดลองและการอภิปรายผลการทดลอง.....	35
4.1 การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส อะไมเลส โปรตีเอส และไลเปส	35
4.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส อะไมเลส โปรตีเอส และไลเปส ที่แยกได้จากดินในพื้นที่ป่านาสีนวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัด มหาสารคาม ประเทศไทย	39
4.3 การจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส อะไมเลส โปรตีเอส และไลเปส ทางอณูชีววิทยาโดยอาศัยเทคนิคยีน 16S rRNA sequencing	86

4.4 กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรไลติก	100
4.4.1 แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส	100
4.4.2 แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส	106
4.4.3 แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอส	111
4.4.4 แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส	117
4.5 การเพิ่มปริมาณชิ้นยีน 16S rRNA gene ด้วยเทคนิค PCR และการศึกษาแผนภูมิลำดับ วิวัฒนาการของแบคทีเรีย	123
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	130
บรรณานุกรม.....	131
ภาคผนวก.....	142
ภาคผนวก ก สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	143
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์.....	146
ภาคผนวก ค ข้อมูลวิเคราะห์ทางสถิติ.....	152
ประวัติผู้เขียน.....	177



สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แผนการดำเนินงานวิจัยหัวข้อการคัดเลือกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลติกที่แยกจากดินในป่านาสีนวน จังหวัดมหาสารคาม ประเทศไทย	4
ตารางที่ 2 แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากแหล่งดินในสภาวะที่เหมาะสม	16
ตารางที่ 3 แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากแหล่งดินในสภาวะที่เหมาะสม	17
ตารางที่ 3 แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากแหล่งดินในสภาวะที่เหมาะสม	18
ตารางที่ 4 แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจากแหล่งดินในสภาวะที่เหมาะสม	20
ตารางที่ 5 แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแหล่งดินต่างๆ ในสภาวะที่เหมาะสม	21
ตารางที่ 6 ลักษณะสิ่งแวดล้อมโดยรอบ ค่าการนำไฟฟ้า และค่า pH ของดินบริเวณป่านาสีนวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม ประเทศไทย	36
ตารางที่ 7 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจำนวน 7 ไอโซเลทที่แยกได้จากดินในป่านาสีนวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม.....	40
ตารางที่ 8 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสจำนวน 32 ไอโซเลทที่แยกได้จากดินในป่านาสีนวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม	44
ตารางที่ 9 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจำนวน 41 ไอโซเลทที่แยกได้จากดินในป่านาสีนวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม	60
ตารางที่ 10 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจำนวน 35 ไอโซเลทที่แยกได้จากดินในป่านาสีนวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม.....	74
ตารางที่ 11 การจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส อะไมเลส โปรตีเอส และไลเปส ด้วยเทคนิค 16S rRNA sequencing	86
ตารางที่ 12 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ หลังบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง	101
ตารางที่ 13 กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสของแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ หลังบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง	107

ตารางที่ 14 กิจกรรมเอนไซม์โปรตีเอสของแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ หลังบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง.....	113
ตารางที่ 15 กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ หลังบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง	119
ตารางที่ 16 สภาวะที่เหมาะสมของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลติก.....	125



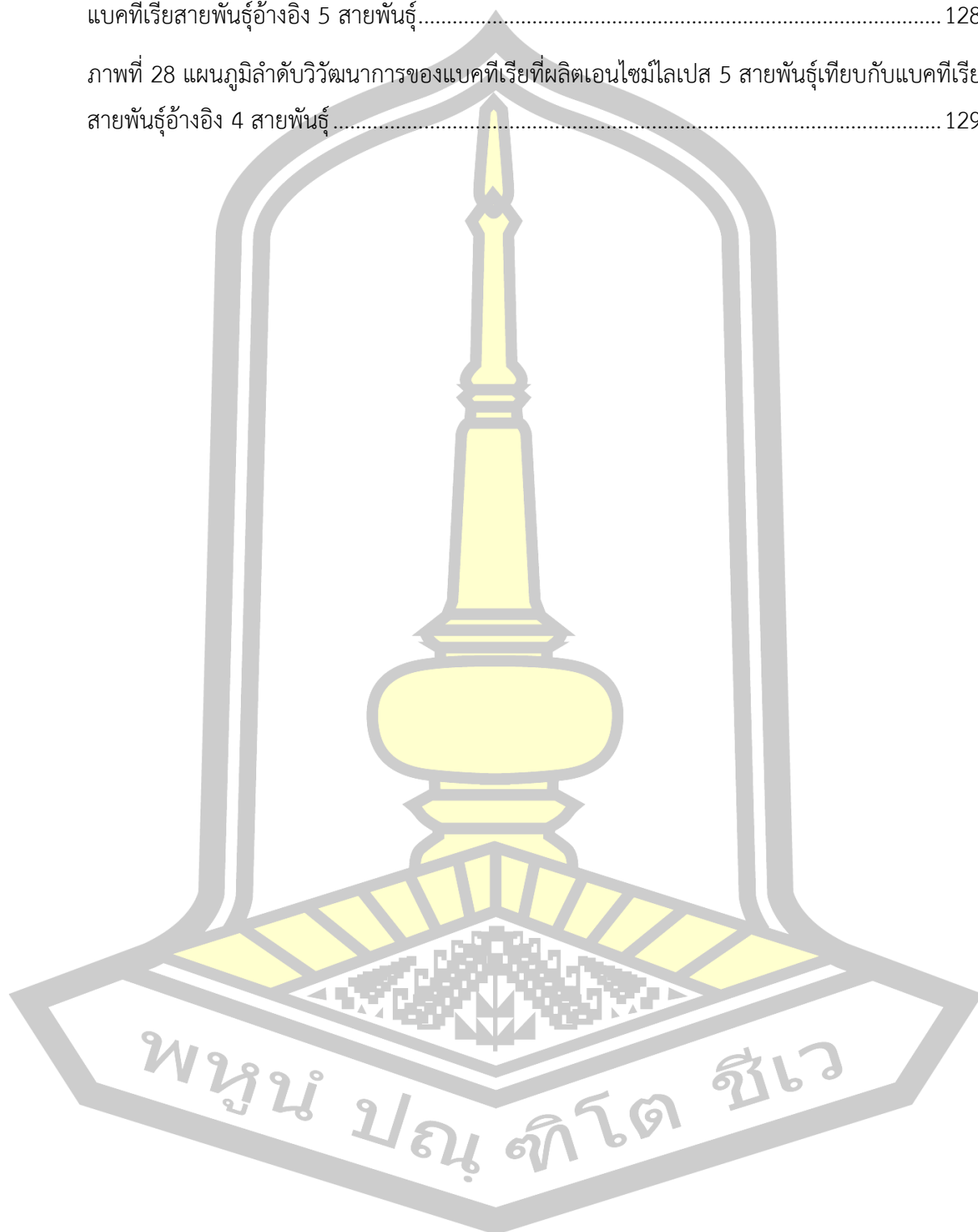
สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 กรอบความคิดของงานวิจัยหัวข้อการคัดเลือกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย	3
ภาพที่ 2 การย่อยเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส.....	7
ภาพที่ 3 การย่อยแป้งด้วยเอนไซม์อะไมเลส.....	10
ภาพที่ 4 ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสไขมันโดยการทำงานของเอนไซม์ไลเปส	13
ภาพที่ 5 สายใยอาหารในดินที่เกิดจากการทำงานร่วมกันของสิ่งมีชีวิตต่างๆ.....	14
ภาพที่ 6 ปีวิจัยที่ 1 พื้นที่เก็บดินแบ่งออกเป็น 3 แปลง แต่ละแปลงแบ่งออกเป็น 4 โซน.....	24
ภาพที่ 7 แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์บนอาหารแข็งที่มีสารตั้งต้นต่างกัน (A) แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหารแข็ง CMC (B) แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสบนอาหารแข็ง starch agar (C) แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสบนอาหารแข็ง skim milk และ (D) แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสบนอาหารแข็ง tributyrin	39
ภาพที่ 8 โคโลนีของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสย่อยเซลลูโลสบนอาหารแข็ง CMC	100
ภาพที่ 9 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดยเชื้อแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> 1.2CL2 <i>B. licheniformis</i> 1.2CL3 และ <i>B. licheniformis</i> 1.1CL5 หลังเหนี่ยวนำในอาหารเหลวที่มี 1% CMC เป็นสารตั้งต้น.....	102
ภาพที่ 10 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสและกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อ <i>B. subtilis</i> 1.2CL2 หลังบ่มในบัฟเฟอร์ที่ pH ต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที.....	103
ภาพที่ 11 กิจกรรมของเอนไซม์และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดยเชื้อ <i>B. subtilis</i> 1.2CL2 หลังบ่มในอุณหภูมิต่างๆ ที่ pH 6 เป็นเวลา 30 นาที.....	104
ภาพที่ 12 โคโลนีของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสย่อยแป้งบนอาหารแข็ง starch.....	106
ภาพที่ 13 กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตโดยเชื้อแบคทีเรีย <i>B. cereus</i> 1.4AL3 <i>B. thuringiensis</i> 3.4AL4 และ <i>B. cereus</i> 3.5AL3 หลังเหนี่ยวนำในอาหารเหลวที่มี 1% สารละลายแป้งเป็นสารตั้งต้น	108

ภาพที่ 14	กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสและกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตโดยเชื้อ <i>B. cereus</i> 3.5AL3 หลังบ่มในบัฟเฟอร์ที่ pH ต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที.....	109
ภาพที่ 15	กิจกรรมเอนไซม์และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อ <i>B. cereus</i> 3.5AL3 หลังบ่มในอุณหภูมิต่างๆ ที่ pH 7 เป็นเวลา 30 นาที.....	110
ภาพที่ 16	โคโลนีของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสย่อยเคซีนบนอาหารแข็ง skim milk.....	112
ภาพที่ 17	กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสที่ผลิตโดยเชื้อแบคทีเรีย <i>B. thuringiensis</i> 1.2PT1 <i>B. cereus</i> 2.1PT3 และ <i>B. thuringiensis</i> 2.3PT3 หลังเหนี่ยวนำในอาหารเหลวที่มี 1% สารละลายเคซีนเป็นสารตั้งต้น.....	113
ภาพที่ 18	กิจกรรมเอนไซม์โปรตีเอสและกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรตีเอสที่ผลิตโดยเชื้อ <i>B. thuringiensis</i> 2.3PT3 หลังบ่มในบัฟเฟอร์ที่ pH ต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที.....	115
ภาพที่ 19	กิจกรรมเอนไซม์โปรตีเอสและกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรตีเอสที่ผลิตโดยเชื้อ <i>B. thuringiensis</i> 2.3PT3 หลังบ่มในบัฟเฟอร์ pH 8 ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที.....	116
ภาพที่ 20	โคโลนีของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสย่อยไขมันบนอาหารแข็ง tributyrin.....	118
ภาพที่ 21	กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตโดยเชื้อแบคทีเรีย <i>Bacterium</i> 1.1LP1 <i>B. licheniformis</i> 1.2LP1 และ <i>B. subtilis</i> 1.3LP2 หลังเหนี่ยวนำในอาหารเหลวที่มี 1% น้ำมันมะกอกเป็นสารตั้งต้น.....	119
ภาพที่ 22	กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสและกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตโดยเชื้อ <i>B. subtilis</i> 1.3LP2 หลังบ่มในบัฟเฟอร์ที่ pH ต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที.....	120
ภาพที่ 23	กิจกรรมเอนไซม์และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อ <i>B. subtilis</i> 1.3LP2 หลังบ่มในอุณหภูมิต่างๆ ที่ pH 7 เป็นเวลา 30 นาที.....	121
ภาพที่ 24	แถบดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียโดยเทคนิค agarose gel electrophoresis PCR product ที่มีขนาด 1,500 bp และ M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kB DNA ladder.....	123
ภาพที่ 25	แผนภูมิลำดับวิวัฒนาการของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส 7 สายพันธุ์เทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิง 6 สายพันธุ์.....	126
ภาพที่ 26	แผนภูมิลำดับวิวัฒนาการของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส 3 สายพันธุ์เทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิง 3 สายพันธุ์.....	127

ภาพที่ 27 แผนภูมิลำดับวิวัฒนาการของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอส 3 สายพันธุ์เทียบกับ
 แบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิง 5 สายพันธุ์..... 128

ภาพที่ 28 แผนภูมิลำดับวิวัฒนาการของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส 5 สายพันธุ์เทียบกับแบคทีเรีย
 สายพันธุ์อ้างอิง 4 สายพันธุ์..... 129



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ป่าสาธารณประโยชน์ตั้งอยู่ที่เขตพื้นที่นาสีนวน ตำบลนาสีนวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม เป็นพื้นที่ที่มีความแตกต่างจากป่าอื่นๆ เนื่องจากพื้นที่ในเขตอำเภอกันทรวิชัยและบางส่วนของอำเภอเชียงยืน จังหวัดมหาสารคาม เป็นป่าที่เกิดบนดินเค็มปานกลางและเค็มจัด (กรมทรัพยากรธรณี, 2552) ซึ่งเป็นดินเค็มพบบริเวณในแอ่งที่ลุ่มหรือตามเชิงเนินที่เป็นพื้นที่ต่อเนื่องระหว่างสภาพพื้นที่แบบลูกคลื่น โดยพบมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น บริเวณจังหวัดมหาสารคาม ขอบเขตแอ่งโคราช เนื่องจากป่าสาธารณประโยชน์แห่งนี้ค่อนข้างมีความหลากหลายและความอุดมสมบูรณ์สังเกตได้จากการเข้าไปหาประโยชน์จากป่านี้ของประชากรในเขตตำบลนาสีนวน เช่น การนำเห็ดจากป่า และการนำพืชสมุนไพรออกมาจำหน่าย เป็นต้น และประชากรในเขตนี้ความยินดีที่จะอนุรักษ์ป่านี้เพื่อสนองพระราชดำริฯ ฉะนั้น ป่าแห่งนี้จึงควรอนุรักษ์เพื่อทำการศึกษาเป็นต้นแบบของป่าดินเค็มและการพัฒนาต่อยอดความรู้ที่ได้ต่อไป

ดิน เป็นที่อยู่อาศัยของจุลินทรีย์หลายชนิด ได้แก่ แบคทีเรีย รา แอคติโนมัยสีท ยีสต์ เป็นต้น แต่สิ่งมีชีวิตที่มีพบมากที่สุด คือ แบคทีเรีย ความหลากหลายของแบคทีเรียเกิดจากลักษณะโครงสร้างหน้าที่และการทำงานที่แตกต่างกัน (Trevors, 1998) ประโยชน์ของแบคทีเรียในดินคือช่วยเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดินและควบคุมการทำงานของพืช (Radhakrishnan and Baek, 2017) แต่จุลินทรีย์บางชนิดก็สามารถก่อให้เกิดโรคในพืช มนุษย์ หรือสัตว์ได้เช่นกัน ปัจจุบันเอนไซม์อุตสาหกรรมส่วนใหญ่มาจากอวัยวะจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์อุตสาหกรรม เนื่องจากสามารถผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลติกที่มีศักยภาพ ค่อนข้างมีความเสถียร และมีคุณสมบัติที่หลากหลาย เมื่อเทียบกับเอนไซม์กลุ่มอื่นที่ได้มาจากพืชและสัตว์ (Rao *et al.*, 1998) นอกจากนี้แบคทีเรียยังสามารถแบ่งเซลล์ได้อย่างรวดเร็วในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต้นทุนต่ำ อุตสาหกรรมต่างๆ จึงนิยมใช้เอนไซม์ไฮโดรไลติกที่ได้จากแบคทีเรียไปใช้ประโยชน์ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมเครื่องหนัง อุตสาหกรรมเครื่องดื่ม อุตสาหกรรมนม อุตสาหกรรมการผลิตขนมปัง เป็นต้น โดยเอนไซม์เซลลูเลส อะไมเลส โปรตีเอส และไลเปสจัดเป็นเอนไซม์ไฮโดรไลติกที่สำคัญและเป็นที่ต้องการของตลาดโลกเป็นอย่างมากและถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายสำหรับการย่อยสลายของสารธรรมชาติต่างๆ สามารถประมาณค่าของการใช้เอนไซม์จากอุตสาหกรรมทั่วโลกในปี ค.ศ. 1995 เติบโตขึ้นจาก 1 พันล้านเหรียญ กระทั่งในปี ค.ศ. 2000 มีการใช้เอนไซม์เพิ่มขึ้นเป็น 1.5 พันล้านเหรียญ และในช่วงสิบปีที่ผ่านมาการเติบโตของการใช้เอนไซม์โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมการทำขนมปังและผลิตอาหารสัตว์มีการเติบโตอย่างรวดเร็ว ซึ่งเกิดจากการ

ประยุกต์ใช้กับอุตสาหกรรมอื่นๆ ที่ครอบคลุมตั้งแต่การสังเคราะห์สารอินทรีย์ไปจนถึงอุตสาหกรรมผลิตกระดาษและเยื่อกระดาษและอุตสาหกรรมการแพทย์ (Kirk *et al.*, 2002) จากรายงานล่าสุดของ BBC กล่าวว่าในปี ค.ศ. 2010 อุตสาหกรรมเอนไซม์มีมูลค่าถึง 3.3 พันล้านเหรียญและคาดว่าจะความต้องการของตลาดนี้จะสูงถึง 4.4 พันล้านเหรียญภายในปี ค.ศ. 2016 และมีอัตราการแนวโน้มการเติบโตรายปี (CAGR) ที่ 6% ภายใน 5 ปีนี้ (Sarrouh *et al.*, 2012)

เอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์จึงมีความสำคัญอย่างมากในการพัฒนากระบวนการผลิตทางอุตสาหกรรมชีวภาพ การประยุกต์ใช้ในปัจจุบันมุ่งเน้นไปยังตลาดที่แตกต่างกันหลายแห่งรวมทั้งการผลิตกระดาษและเยื่อกระดาษ อุตสาหกรรมผลิตเครื่องหนัง อุตสาหกรรมซักฟอกและสิ่งทอ รวมถึงยา เคมีภัณฑ์ อาหารและเครื่องดื่ม เชื้อเพลิงชีวภาพ อาหารสัตว์ การแพทย์ และอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง ดังนั้นในปัจจุบันจึงจำเป็นต้องมีการปรับปรุงกระบวนการผลิตเอนไซม์มากขึ้นเพื่อพัฒนากระบวนการผลิตที่แปลกใหม่ยิ่งขึ้นและสอดคล้องกับความต้องการของเศรษฐกิจ ความหลากหลายของจุลินทรีย์และเทคนิคทางโมเลกุลที่ทันสมัย เช่น การนำศาสตร์ของเมตาจีโนมิกส์และจีโนมิกส์ มาใช้ในการค้นหาเอนไซม์จากจุลินทรีย์ชนิดใหม่ที่ผลิตจากแบคทีเรียและราซึ่งสามารถปรับปรุงหรือแก้ไขได้ด้วยเทคโนโลยีที่แตกต่างกัน (Adrio and Demain, 2014)

เนื่องด้วยดินในป่านาสีนวนค่อนข้างมีความอุดมสมบูรณ์ มีความหลากหลายทางชีวภาพของพืชและน่าจะมีความหลากหลายของแบคทีเรีย จึงทำให้ผู้วิจัยสนใจศึกษาการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลติกที่สำคัญทางอุตสาหกรรมและศึกษาคุณสมบัติในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์จากเชื้อแบคทีเรียที่คัดกรองได้จากพื้นที่ดังกล่าวเพื่อนำไปประยุกต์ใช้และพัฒนาต่อยอดความรู้ในทางอุตสาหกรรมต่อไป

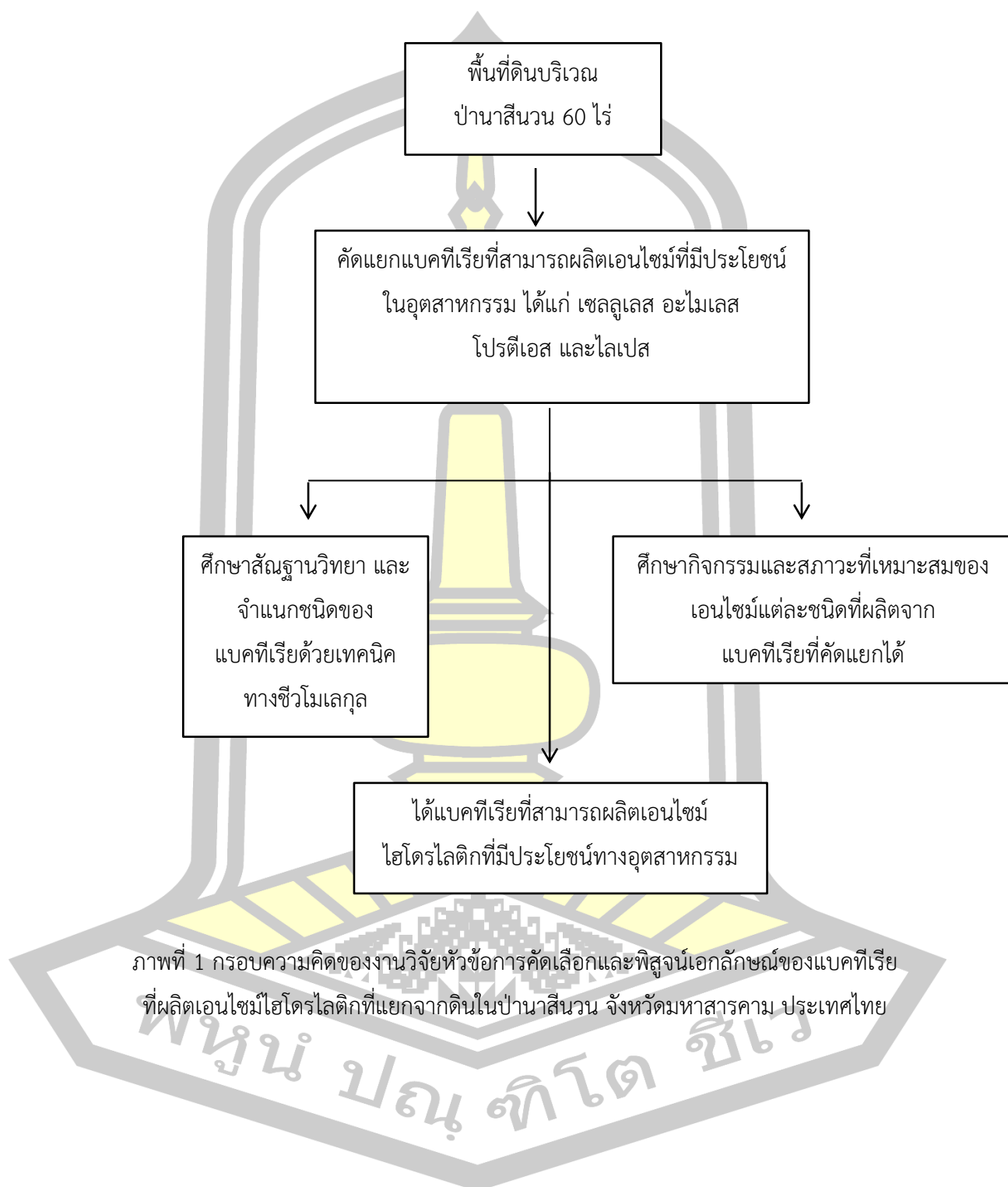
1.2 วัตถุประสงค์

- 1) เพื่อคัดเลือกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลติกที่มีประโยชน์ในอุตสาหกรรมที่พบในดินบริเวณป่านาสีนวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม
- 2) เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของกิจกรรมเอนไซม์ไฮโดรไลติกจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในดินบริเวณป่านาสีนวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ทราบถึงสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลติกที่มีประโยชน์ในอุตสาหกรรมที่พบในดินบริเวณป่านาสีนวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม
- 2) ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมของกิจกรรมเอนไซม์ไฮโดรไลติกจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในดินบริเวณป่านาสีนวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม

1.4 กรอบความคิดของงานวิจัย



1.5 แผนการดำเนินงานวิจัย

ตารางที่ 1 แผนการดำเนินงานวิจัยหัวข้อการคัดเลือกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลติกที่แยกจากดินในป่านาสีนวน จังหวัดมหาสารคาม ประเทศไทย

แผนงานวิจัย	เดือนที่					
	1 - 2 มี.ย - ก.ค.	3-4 ส.ค.-ก.ย.	5-6 ต.ค.- พ.ย.	7-8 ธ.ค.- ม.ค.61	9-10 ก.พ.-มี.ค.	11-12 เม.ย.- พ.ค.
1.เก็บตัวอย่างดิน ทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพของดิน	↔					
2. แยกเชื้อให้บริสุทธิ์ ศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและทางชีวเคมีของเชื้อ	↔					
3. ศึกษากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์จากเชื้อที่แยกได้		↔				
4. จำแนกสายพันธุ์จุลินทรีย์			↔			
5. วิเคราะห์ข้อมูลวิวัฒนาการของจุลินทรีย์					↔	
6. จัดทำรูปเล่มและเตรียมนำเสนอ					↔	



บทที่ 2

ทบทวนเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แบคทีเรียในดิน

ดิน เป็นสภาพแวดล้อมที่มีความซับซ้อนซับซ้อนและมีแร่ธาตุหลายชนิดประกอบด้วยสารอินทรีย์ที่อยู่ในรูปของเหลวและก๊าซ (Tyc *et al.*, 2017) นอกจากนี้ยังเป็นที่อยู่อาศัยของจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย รา แอคติโนมัยสีท สาหร่าย โปรโตซัว และไวรัส นอกจากนี้ในดินยังมีสัตว์หน้าดินและแมลงหน้าดินจึงทำให้เกิดการหมุนเวียนของแร่ธาตุและสารอาหารของสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในดิน (Aislabie *et al.*, 2013) แบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตที่เล็กที่สุดและไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับอนุภาคของดินเหนียว (น้อยกว่า 0.2 ไมโครเมตร) และอนุภาคดินทราย (2-50 ไมโครเมตร) (Hoorman, 2011) รูปร่างของแบคทีเรียมีหลายแบบ เช่น รูปร่างกลม ท่อนเกลียว หรือบางชนิดมีรูปร่างเหมือนเส้นใยรา เช่น แอคติโนมัยสีท (Aislabie *et al.*, 2013) บทบาทของแบคทีเรียในดิน คือ มีทำหน้าที่สำคัญในการสลายตัวของสารอินทรีย์ในดินจากเอนไซม์ที่หลั่งออกมา สามารถแบ่งแบคทีเรียในดินได้เป็น 4 กลุ่ม ได้แก่

- 1) ผู้ย่อยสลาย (Decomposers) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถย่อยน้ำตาลและสารประกอบคาร์บอนอย่างง่าย เช่น บริเวณที่รากพืชที่มีการปล่อยสารประกอบอินทรีย์ (root exudates) (Hoorman, 2011)

- 2) แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในรากพืช ส่วนใหญ่มักทำหน้าที่ตรึงธาตุไนโตรเจนในอากาศหรือไรโซเบียม (Rhizobia) โดยแบคทีเรียจะตรึงไนโตรเจนในอากาศและเปลี่ยนเป็นรูปที่พืชสามารถใช้ได้สะดวก และสามารถเพิ่มไนโตรเจนได้มากกว่า 100 กิโลกรัมต่อเฮกตาร์ต่อปีต่อดิน แบคทีเรียไรโซเบียม คือ แบคทีเรียที่มีลักษณะพิเศษอาศัยอยู่ในปมรากถั่ว (Conklin, 2002)

- 3) แบคทีเรียก่อโรคในพืช เช่น *Pseudomonas syringae* pathovars ที่ก่อโรคพืช *Ralstonia solanacearum* ที่ส่งผลกระทบต่อ การปลูกมันฝรั่งและกล้วย *Erwinia amylovora* ที่ก่อให้เกิดโรค Fire blight ส่งผลให้ผลไม้ไม่มีตัวอ่อนของเพลี้ยทำให้แอปเปิ้ลและแพร์เกิดการเน่าและสร้างความเสียหาย (Mansfield *et al.*, 2012)

- 4) Lithotrophs หรือ chemoautotrophs คือแบคทีเรียกลุ่มที่ได้รับพลังงานจากสารประกอบของไนโตรเจน กำมะถัน เหล็กหรือไฮโดรเจนแทนจากสารประกอบคาร์บอน ซึ่งมีความสำคัญต่อการหมุนเวียนไนโตรเจนและการย่อยสลายสารมลพิษ (Hoorman, 2011)

บทบาทต่างๆ ของแบคทีเรียเหล่านี้มีความสัมพันธ์กับสารเมตาบอไลต์ที่สร้างขึ้นมาเพื่อทำหน้าที่ในการย่อยสลายตั้งต้นที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อการเจริญ อีกทั้งยังทำให้เกิดการหมุนเวียน

ของสสารและแร่ธาตุต่างๆ รวมถึงการผลิตเอนไซม์ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในทางอุตสาหกรรม เพื่อก่อให้เกิดกระบวนการผลิตและผลิตภัณฑ์ที่หลากหลายตอบสนองต่อความต้องการของผู้บริโภคในปัจจุบัน

2.2 เอนไซม์ไฮโดรไลติกที่ได้จากแบคทีเรีย

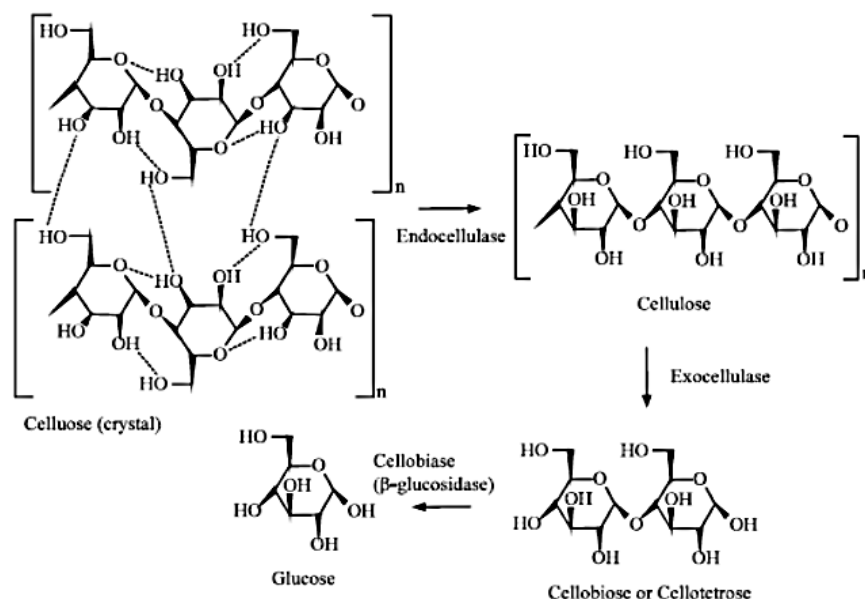
เอนไซม์ไฮโดรไลติกสามารถพบได้ในสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันเอนไซม์จากจุลินทรีย์กำลังได้รับความนิยมในทางอุตสาหกรรมเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีความสามารถในการปรับตัวให้เข้ากับสภาวะของกระบวนการผลิตที่ดีขึ้น (Maki *et al.*, 2012) เอนไซม์ไฮโดรไลติกที่สำคัญทางอุตสาหกรรม ได้แก่ เซลลูเลส ไลเปส โปรตีเอส อะไมเลส ไซลานเนส เป็นต้น สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมที่หลากหลาย เช่น การผลิตผงซักฟอก การแปรรูปในอุตสาหกรรมกระดาษ และเยื่อกระดาษ ตลอดจนอุตสาหกรรมสิ่งทอและอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ (Howard *et al.*, 2003)

2.2.1 เอนไซม์เซลลูเลส

เซลลูโลส เป็นโพลีแซคคาไรด์ที่อุดมสมบูรณ์และเป็นแหล่งพลังงานหมุนเวียนที่พบมากที่สุดในโลก (Dawson and Ehleringer, 1993) โครงสร้างของเซลลูโลสประกอบด้วยโมเลกุลของ β -1,4-linked anhydro D-glucose (Heck *et al.*, 2002) กับกลุ่มไฮดรอกซิลและอะตอมของไฮโดรเจน ความสัมพันธ์ของพันธะไกลโคซิดิกนั้นไม่เพียงแต่ทำหน้าที่กำหนดคุณสมบัติทางเคมีของเซลลูโลสแต่ยังทำหน้าที่เป็นบริเวณที่ปฏิกิริยาทางเคมีและปฏิกิริยาของเอนไซม์ทำงานสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ (Acharya and Chaudhary, 2012)

การย่อยสลายเซลลูโลสโดยเอนไซม์เซลลูเลสเกี่ยวข้องกับการดูดซับเอนไซม์บนผิวและเกิดจากการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ต่างๆ อันดับแรกเอนไซม์ β -1-4-endoglucanases (E.C. 3.2.1.176) และ β -1-4-exoglucanases (E.C. 3.2.1.91; cellobiohydrolases) จะย่อยสลายเซลลูโลสให้เป็นเซลลูโบไอโอส (cellobiose) จากนั้น β -glucosidase (E.C. 3.2.1.21) จะย่อยเซลลูโบไอโอสต่อเพื่อให้ได้เป็นน้ำตาลกลูโคส (Wood and McCrae, 1986) ภาพที่ 2

พหุ ประถมศึกษา



ภาพที่ 2 การย่อยเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส
(แหล่งที่มา: Karmakar and Ray, 2011)

ประสิทธิภาพและประสิทธิผลโดยกระบวนการที่โอลิโกแซ็กคาไรด์และไดแซ็กคาไรด์ถูกย่อยเป็นน้ำตาลที่มีขนาดโมเลกุลเล็กลง (Saccharification) มีปัจจัยที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ คุณสมบัติตัวติดบริเวณวิธีการปรับสภาพและภาวะไฮโดรไลซิส เช่น การใช้เอนไซม์ผสมและประเภทของเซลลูเลส (Harshvardhan *et al.*, 2013) เซลลูเลสจัดเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ต้องอาศัยตัวกระตุ้นชักนำให้เกิดการหลั่งออกมา (inducible enzyme) ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดการผลิตเอนไซม์ได้โดยอาศัยการเติมเซลโลไบโอสที่มีความเข้มข้นต่ำๆ ลงไปในช่วงที่จุลินทรีย์มีอัตราการเจริญเติบโตช้า (Ghose, 1987) ส่วนมากพบในพืช แมลง และจุลินทรีย์ ซึ่งพบในแบคทีเรียและเชื้อราเป็นแหล่งสำคัญ (Watanabe and Tokuda, 2010) แบคทีเรียที่เจริญในสภาพไร้อากาศหลายสายพันธุ์สามารถปล่อยโมเลกุลของเซลลูเลสอิสระเพื่อย่อยเซลลูโลส ได้แก่ *Cellulomonas Pseudomonas Geobacillus Erwinia Streptomyces Fibrobacter Bacillus* และ *Paenibacillus* (Maki *et al.*, 2012) เชื้อราบางสายพันธุ์ เช่น *Trichoderma reesei* และ *Phanerochaete chrysosporium* สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมผลิตพลังงาน โดยจะย่อยชีวมวลให้เปลี่ยนเป็นโมเลกุลน้ำตาลและเปลี่ยนให้เป็นแอลกอฮอล์ (Watanabe and Tokuda, 2010) นอกจากนี้ยังมีราที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ได้แก่ *Trichoderma koningii Penicillium funiculosum Fusarium solani Myrothecium verrucaria Sporotrichum pulverulentum* และ *Aspergillus niger*

การจัดประเภทของเอนไซม์เซลลูเลส

จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสไม่ว่าจะเป็นแบบอิสระหรือเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายและเผาผลาญเซลลูโลสที่ไม่ละลายน้ำ (Sadhu and Maiti, 2013) จัดเป็นเอนไซม์ที่มีการทำปฏิกิริยาที่ซับซ้อนกับสารตั้งต้นที่หลากหลาย จึงทำให้มีการจัดประเภทตามรูปแบบการเร่งของปฏิกิริยา ดังต่อไปนี้

1) Endoglucanase หรือ Endo-1,4- β -D-Glucan Glucanohydrolase (EC 3.2.1.4) เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่มีการสุมตัดที่ตำแหน่งภายในภายในของโครงสร้างเซลลูโลสที่มีลักษณะเป็นโพลีแซคคาไรด์ซึ่งสร้างโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีความยาวต่างๆ และทำให้เกิดสายของโพลีแซคคาไรด์เพิ่มมากขึ้น โดยทั่วไปเอนไซม์กลุ่มนี้มักมีฤทธิ์ต่อเซลลูโลสที่เป็นกรดอนุพันธ์ของเซลลูโลสที่ละลายน้ำได้ เช่น CMC และ cellooligosaccharide

2) Exoglucanase หรือ 1,4- β -D-Glucan Cellobiohydrolase (Cellobiohydrolase) (EC 3.2.1.91) ทำหน้าที่หลักในการย่อยโครงสร้างของสายโพลีแซคคาไรด์เพื่อปลดปล่อยโมเลกุลของกลูโคส (glucanohydrolase) หรือเซลโลไบโอส (cellobiohydrolase) เป็นผลิตภัณฑ์หลักและเอนไซม์เหล่านี้มีฤทธิ์ต่อสารตั้งต้นที่มีโครงสร้างเป็นผลึก (Crystalline) เช่น Avicel และเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์

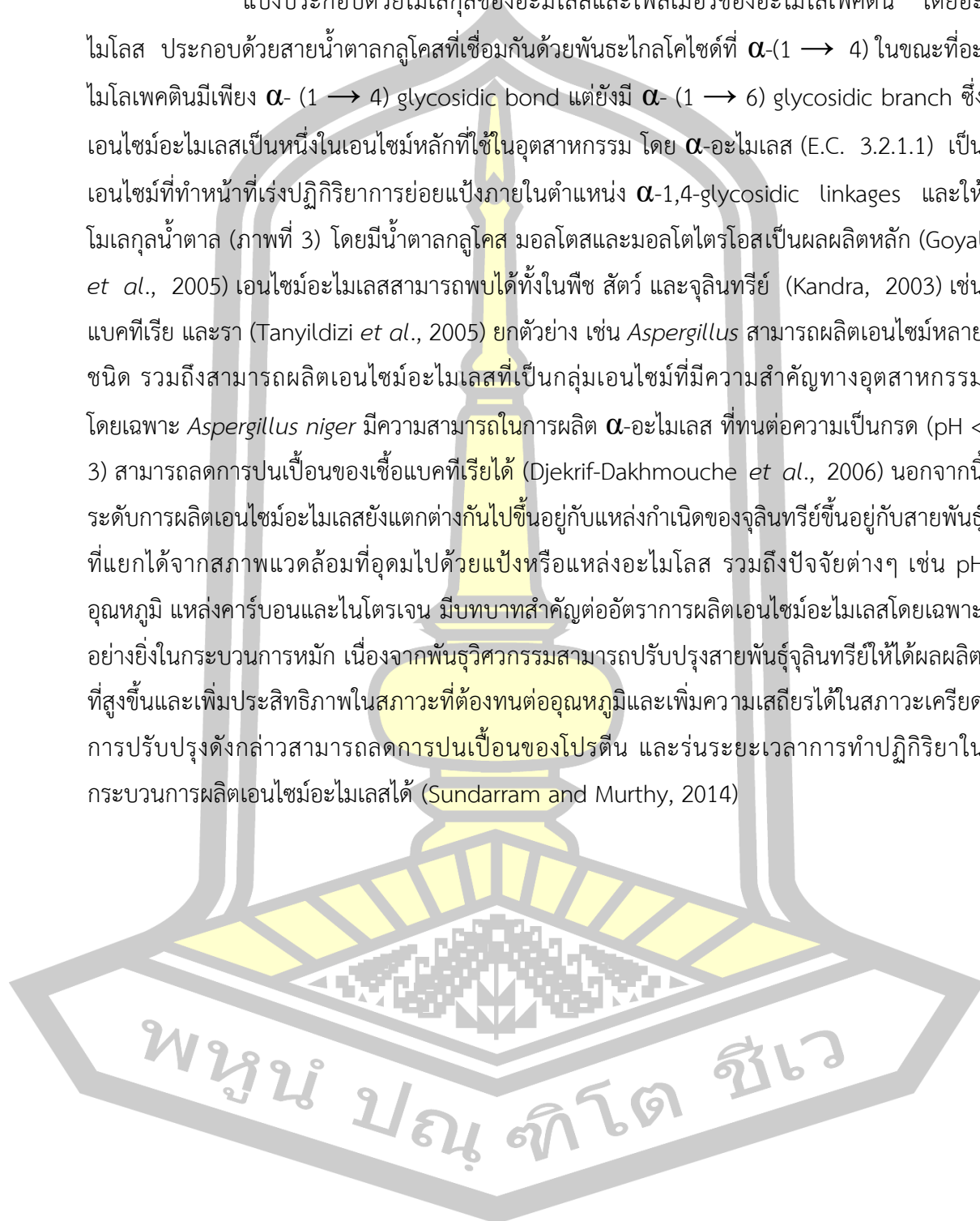
3) Exoglucanase หรือ 1, 4- β -D-Oligoglucan Cellobiohydrolase (หรือที่รู้จักในนามของ Cellodextrinases) (EC 3.2.1.74) มักทำปฏิกิริยาเพื่อกำจัดเซลโลไบโอสจากเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์หรือจาก p-nitrophenyl- β -D-cellobioside

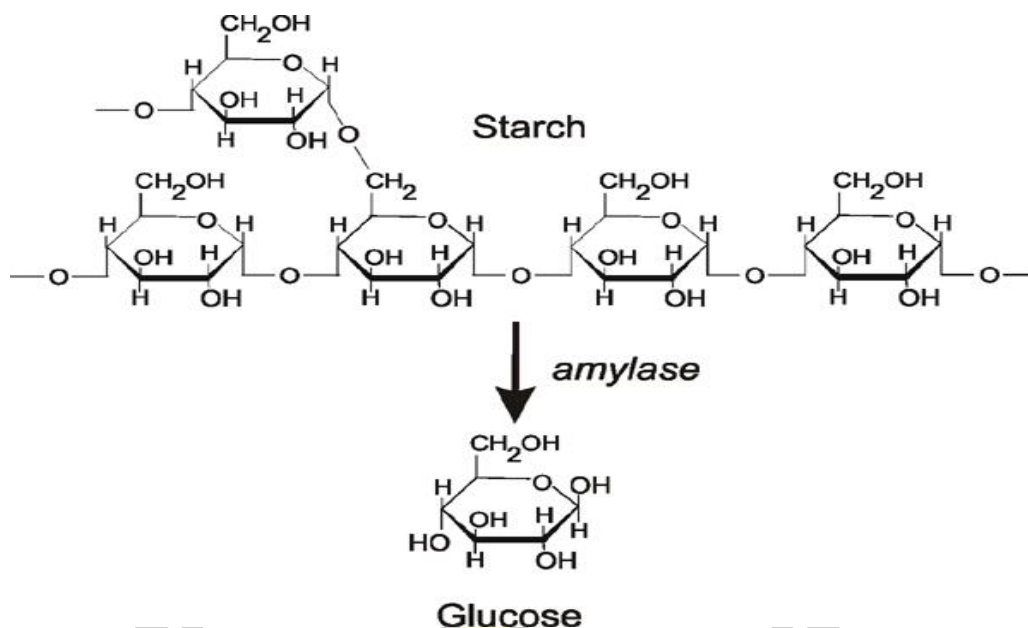
4) β -Glucosidase หรือ β -D-Glucoside Glucohydrolase (EC 3.2.1.21) สามารถย่อยโครงสร้างของเซลลูโลสที่สามารถละลายน้ำได้ เช่น เซลโลเดกซ์ตรินและเซลโลไบโอสให้เป็นน้ำตาลกลูโคส ซึ่งจะไม่ทำปฏิกิริยาต่อเซลลูโลสที่โครงสร้างเป็นผลึกหรืออยู่ในรูปของอิมัลชัน

ปัจจุบันเอนไซม์เซลลูเลสและเพคติเนสมีส่วนทำให้ตลาดเอนไซม์ทั่วโลกเติบโตประมาณ 20% โดยอุตสาหกรรมหลายประเภทนิยมใช้ประโยชน์จากเอนไซม์เซลลูเลส (Phitsuwan *et al.*, 2013) เช่น ในทางอุตสาหกรรมผลิตน้ำผลไม้ นอกจากนี้เซลลูเลสยังถูกนำมาใช้เพิ่มปริมาตรของน้ำผลไม้และช่วยให้น้ำผลไม้มีความใสขึ้น (Minussi *et al.*, 2002) อุตสาหกรรมการผลิตผงซักฟอกใช้เอนไซม์เซลลูเลสช่วยขจัดสิ่งสกปรกและเพิ่มความสดใสให้แก่สิ่งทอ รวมถึงอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษและสิ่งพิมพ์ พลังงานชีวภาพ และอาหาร

2.2.2 เอนไซม์อะไมเลส

แป้งประกอบด้วยโมเลกุลของอะมิโลสและโพลิเมอร์ของอะไมโลเพคติน โดยอะมิโลส ประกอบด้วยสายน้ำตาลกลูโคสที่เชื่อมกันด้วยพันธะไกลโคไซด์ที่ α -(1 \rightarrow 4) ในขณะที่อะไมโลเพคตินมีเพียง α -(1 \rightarrow 4) glycosidic bond แต่ยังมี α -(1 \rightarrow 6) glycosidic branch ซึ่งเอนไซม์อะไมเลสเป็นหนึ่งในเอนไซม์หลักที่ใช้ในอุตสาหกรรม โดย α -อะไมเลส (E.C. 3.2.1.1) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยแป้งภายในตำแหน่ง α -1,4-glycosidic linkages และให้โมเลกุลน้ำตาล (ภาพที่ 3) โดยมีน้ำตาลกลูโคส มอลโตสและมอลโตไตรโอสเป็นผลผลิตหลัก (Goyal *et al.*, 2005) เอนไซม์อะไมเลสสามารถพบได้ทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ (Kandra, 2003) เช่น แบคทีเรีย และรา (Tanyildizi *et al.*, 2005) ยกตัวอย่าง เช่น *Aspergillus* สามารถผลิตเอนไซม์หลายชนิด รวมถึงสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสที่เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่มีความสำคัญทางอุตสาหกรรม โดยเฉพาะ *Aspergillus niger* มีความสามารถในการผลิต α -อะไมเลส ที่ทนต่อความเป็นกรด (pH < 3) สามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียได้ (Djekrif-Dakhmouche *et al.*, 2006) นอกจากนี้ระดับการผลิตเอนไซม์อะไมเลสยังแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับแหล่งกำเนิดของจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ที่แยกได้จากสภาพแวดล้อมที่อุดมไปด้วยแป้งหรือแหล่งอะมิโลส รวมถึงปัจจัยต่างๆ เช่น pH อุณหภูมิ แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน มีบทบาทสำคัญต่ออัตราการผลิตเอนไซม์อะไมเลสโดยเฉพาะอย่างยิ่งในกระบวนการหมัก เนื่องจากพันธุวิศวกรรมสามารถปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ให้ได้ผลผลิตที่สูงขึ้นและเพิ่มประสิทธิภาพในสภาวะที่ต้องทนต่ออุณหภูมิและเพิ่มความเสถียรได้ในสภาวะเครียด การปรับปรุงดังกล่าวสามารถลดการปนเปื้อนของโปรตีน และร่นระยะเวลาการทำปฏิกิริยาในกระบวนการผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ (Sundarram and Murthy, 2014)





ภาพที่ 3 การย่อยแป้งด้วยเอนไซม์อะไมเลส

(แหล่งที่มา : Robyt, 2008)

เอนไซม์อะไมเลส มีศักยภาพในการประยุกต์ใช้ร่วมกับกระบวนการอุตสาหกรรมอาหารหมัก และเภสัชกรรม สำหรับทางเทคโนโลยีชีวภาพสามารถนำเอนไซม์อะไมเลสมาใช้ประโยชน์ในด้านการลดสารพิษทางสิ่งแวดล้อมได้ แบคทีเรียหลากหลายสามารถผลิตเอนไซม์ภายนอกหรือภายในเซลล์ที่สามารถเปลี่ยนแป้งหรือไกลโคเจนให้เป็นน้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอนที่เซลล์นำไปใช้ได้ง่าย (Mojsov, 2012) เช่น *Bacillus* sp. ได้แก่ *B. subtilis* *B. stearothermophilus* *B. amyloliquefaciens* *B. licheniformis* *B. coagulans* *B. polymyxa* *B. mesentericus* *B. vulgaris* *B. megaterium* *B. cereus* *B. halodurans* และ *Bacillus* sp. โดยเอนไซม์อะไมเลสมีสัดส่วนประมาณ 25% ของตลาดเอนไซม์ทั่วโลก มีรายงานที่ศึกษากรรมวิธีทางพันธุวิศวกรรมโดยอาศัยเอนไซม์อะไมเลสมาใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหาร และอุตสาหกรรมแปรรูปอาหาร เช่น การอบ การต้ม การเตรียมอาหาร ช่วยในการย่อยอาหาร การผลิตเค้ก น้ำผลไม้และน้ำเชื่อม เป็นต้น

เอนไซม์อะไมเลสเป็นหนึ่งในเอนไซม์อุตสาหกรรมที่มีบทบาทอย่างยิ่งในทางอุตสาหกรรมต่างๆ และอุตสาหกรรมยา ข้อได้เปรียบของเอนไซม์อะไมเลสคือ สามารถนำมาสังเคราะห์น้ำตาล thio-sugars ซึ่งเป็นน้ำตาลที่เกี่ยวข้องกับยารักษาสมัยใหม่ที่และกำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก โดยน้ำตาล thio-sugars เป็นสารประเภทคาร์โบไฮเดรตสามารถนำมาออกแบบในการผลิตยาต่างๆ ที่อาศัยการควบคุมการทำงานร่วมกันระหว่างเอนไซม์ไลเปสและอะไมเลส ที่ทำงานประสานกันของเทคโนโลยีสมัยใหม่ เช่น เทคโนโลยีชีวภาพทางการแพทย์ เทคโนโลยีพลังงาน และ

เทคโนโลยีการเกษตรจึงช่วยเร่งการผลิตทางอุตสาหกรรมให้มีขนาดใหญ่ และจำเป็นต้องอาศัยองค์ความรู้การใช้เทคโนโลยีการหมักของเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสมว่าควรเลือกเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อรา และการประยุกต์ใช้กับเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น เทคโนโลยีการตรวจหาสายพันธุ์จุลินทรีย์ควบคู่ไปกับเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมของสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสที่ดีที่สุดจึงจะช่วยเพิ่มการผลิตเอนไซม์อะไมเลสทางอุตสาหกรรมอาหารและยา (Machida *et al.*, 2005)

2.2.3 เอนไซม์โปรตีเอส

โปรตีเอส เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนให้เป็นเปปไทด์สายสั้นๆ หรือกรดอะมิโน และโอลิโกเปปไทด์ สามารถพบได้ทั้งในพืช สัตว์และจุลินทรีย์ เอนไซม์โปรตีเอสที่ได้จากสัตว์ เช่น เรนินจากกระเพาะลูกวัวมีบทบาทสำคัญในการทำให้โปรตีนเสียสภาพและเกิดการตกตะกอนโปรตีนจึงทำให้สามารถนำไปผลิตเป็นเนยแข็งได้ แต่เอนไซม์โปรตีเอสที่ได้จากแบคทีเรียและราจะมีบทบาทมากที่สุด เอนไซม์โปรตีเอสมีหลายประเภทซึ่งมีลักษณะที่แตกต่างกันทางด้านความจำเพาะต่อสารตั้งต้น กลไกการเร่งปฏิกิริยา ลักษณะของบริเวณเร่งปฏิกิริยา สารยับยั้งและสารเร่งปฏิกิริยา ลำดับของกรดอะมิโนในโมเลกุล ช่วง pH และช่วงอุณหภูมิในการทำงาน เสถียรภาพของเอนไซม์ และน้ำหนักโมเลกุล เป็นต้น ดังนั้น จึงได้มีการจัดกลุ่มของเอนไซม์โปรตีเอสไว้ด้วยกันหลายวิธี เช่น จัดแบ่งกลุ่มตามลักษณะของแหล่งกำเนิด ได้แก่ จากสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ หรือจัดแบ่งกลุ่มตามลักษณะการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ ได้แก่ การย่อยสลายพันธะเปปไทด์จากปลายสายโพลีเปปไทด์ (exopeptidase) การย่อยสลายพันธะเปปไทด์อย่างอิสระภายในสายเปปไทด์ (endopeptidase) หรือแบ่งกลุ่มตามลักษณะบริเวณเร่งปฏิกิริยา (active site) ของเอนไซม์ 4 ชนิดดังต่อไปนี้

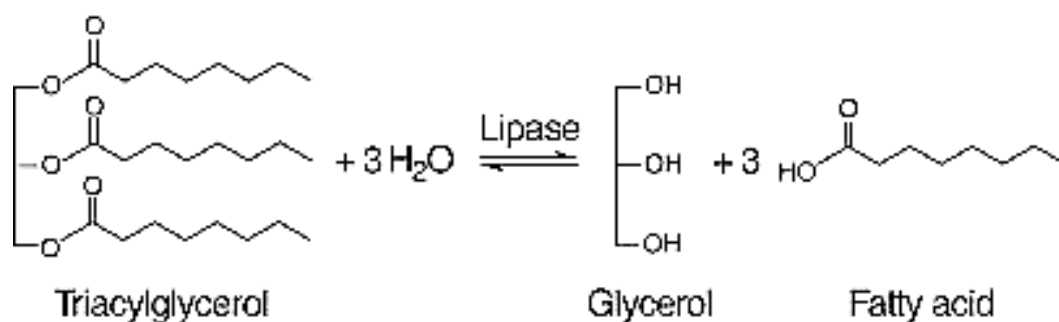
- 1) Alkaline protease (serine protease)
- 2) Acid protease (carboxyl protease)
- 3) Thiol protease (sulfhydryl protease)
- 4) Metallo protease (neutral protease)

Alcalase เป็นอัลคาไลน์โปรตีเอสที่ใช้ในทางการค้า ซึ่งมีความจำเพาะกับกรดอะมิโนไฮโดรโฟบิก เมื่อนำไปย่อยสลายโปรตีนจะได้ไฮโดรไลสที่มีความขมลดลง เช่น หางนม สำหรับอัลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตจาก *B. amyloliquefaciens* สามารถผลิตโปรตีนจากถั่วลูกไก่ (chick pea protein) ไฮโดรไลสที่อุดมไปด้วยเมทไทโอนีน มีการนำโปรตีนไฮโดรไลสจากเคซีน หางนม และถั่วเหลืองไปเป็นส่วนผสมในสูตรอาหารทารกที่เป็นโรคภูมิแพ้ นอกจากนี้ยังนำ Thermophilic alkaline protease ทำให้เนื้อนุ่มมักใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อกระป๋อง ซุป และเครื่องปรุง เป็นต้น

การประยุกต์ใช้โปรตีนเอสในอุตสาหกรรมแปรรูปอาหาร อุตสาหกรรมนม และยาเป็นที่รู้จักกันแพร่หลาย เนื่องจากเอนไซม์โปรตีนเอสที่ได้จากเชื้อรา *Aspergillus oryzae* มักนิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหารในเอเชีย โดยนำเชื้อราดังกล่าวมาหมักหรือการแปรรูปอาหาร เชื้อรา *A. oryzae* สามารถเจริญได้ดีบนอาหารแข็งหรือวัสดุเหลือทิ้งได้จากการเกษตร เป็นราสายพันธุ์ที่ไม่เป็นพิษต่อผู้บริโภคและปลอดภัยในการผลิตเอนไซม์อาหาร เพราะไม่มียีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารพิษอะฟลาท็อกซิน (Machida *et al.*, 2005) อย่างไรก็ตามการประยุกต์ใช้โปรตีนเอสเพื่อการค้าอย่างมีประสิทธิภาพมีปัจจัยหลายอย่างมาเกี่ยวข้อง เช่น อุณหภูมิสูง ค่า pH สารเร่งความเข้มข้นของแคลเซียม สารชักพอก นอกจากนี้ยังพบว่าแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์และอนินทรีย์ แหล่งโลหะไอออน สารลดแรงตึงผิว สารฆ่าเชื้อราและสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งมีผลต่อกระบวนการผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสให้มีประสิทธิภาพ (Anwar and Saleemuddin, 1998)

2.2.4 เอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปส (E.C. 3.1.1.3) คือ เอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและการไฮโดรไลซ์พันธะเอสเทอร์ของโมเลกุลไตรกลีเซอรอลและกรดไขมันสายยาว ได้ผลผลิตเป็นโมโนกลีเซอรอล ไดกลีเซอรอลและกรดไขมันอิสระ (ภาพที่ 4) เนื่องจากสารตั้งต้นของไลเปสมักเป็นโมเลกุลที่ไม่ละลายน้ำแต่สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ หรือตัวกลางที่ประกอบไปด้วยน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ เอนไซม์ไลเปสสามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ แต่ไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์จะมีมูลค่าทางการค้ามากกว่า (Saxena *et al.*, 2017) จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสมักมีแหล่งที่อยู่อาศัยที่หลากหลาย เช่น ขยะ โรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปน้ำมันพืช ดินที่ปนเปื้อนด้วยน้ำมันบริเวณโรงรีดน้ำมัน ฯลฯ (Sztajer *et al.*, 1988) แบคทีเรียส่วนใหญ่ที่ผลิตเอนไซม์จะผลิตออกสู่นอกเซลล์ โดยมีปัจจัยต่างๆ มาเกี่ยวข้อง เช่น อุณหภูมิ pH แหล่งไนโตรเจนและคาร์บอน กลีออนินทรีย์ การกวนและความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลาย (Gupta *et al.*, 2004) ส่วนใหญ่แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสมาจากแบคทีเรียแกรมลบโดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Pseudomonas* ที่มีอย่างน้อย 7 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส ได้แก่ *P. aeruginosa* *P. alcaligenes* *P. fragi* *P. glumae* *P. cepacia* *P. fluorescens* และ *P. putida* (Sztajer *et al.*, 1988) วิธีที่ง่ายและน่าเชื่อถือสำหรับการตรวจสอบจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส คือ การใช้ tributyrin เป็นสารตั้งต้น และสังเกตจากการสร้างวงใสรอบๆ โคลนีย์ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี tributyrin (Ertugrul *et al.*, 2007) สารเคมีที่สำคัญทางอุตสาหกรรมบางชนิดที่ผลิตจากไขมันและน้ำมันโดยกระบวนการทางเคมีสามารถชักนำให้ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม



ภาพที่ 4 ปฏิกริยาไฮโดรไลซิสไขมันโดยการทำงานของเอนไซม์ไลเปส
(แหล่งที่มา : Jaeger and Reetz, 1998)

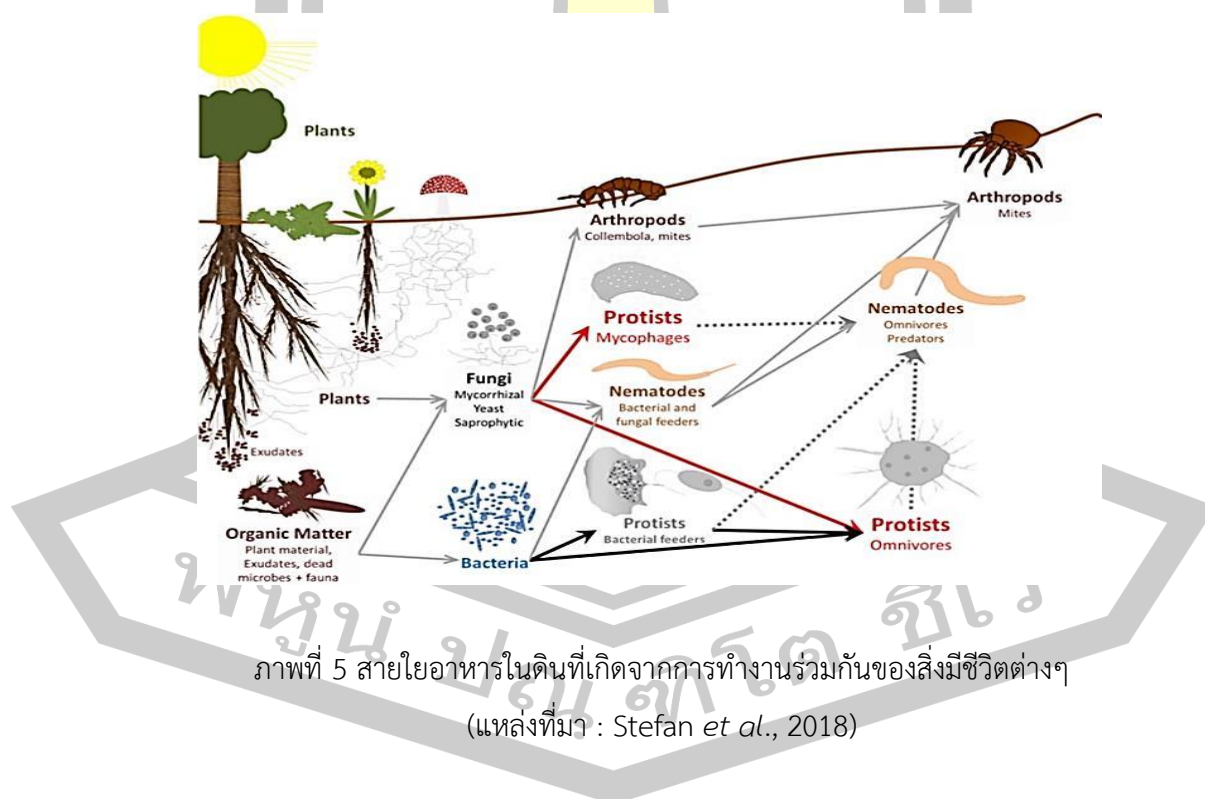
ปัจจุบันนี้ เอนไซม์อุตสาหกรรมทางตลาดโลกให้มูลค่าสูงถึง 4.2 พันล้านดอลลาร์ ในปี 2014 และคาดว่าจะมีอัตราการเติบโตต่อปี (CAGR) ประมาณ 7% และในช่วงปี 2015-2020 คาดการณ์ว่าอาจสร้างมูลค่าถึง 6.2 พันล้านดอลลาร์ การแปรรูปไขมันและน้ำมันจึงเป็นสิ่งสำคัญในอุตสาหกรรมแปรรูปอาหาร และเป็นที่ต้องการมากทางเศรษฐกิจและเทคโนโลยีการเกษตร น้ำมันพืชที่มีคุณค่าทางโภชนาการโดยมีคุณสมบัติของไตรกลีเซอรอลเป็นสิ่งสำคัญในอนาคต จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจะมีการทำงานจำเพาะกับกรดไขมันจึงสามารถนำมาผลิตเป็นน้ำมันพืชได้ นอกจากนี้น้ำมันราคาถูกสามารถนำมาอัพเกรดได้โดยการสังเคราะห์ไตรกลีเซอรอลที่มีคุณค่าสำคัญทางโภชนาการ เช่น ใช้เป็นวัตถุดิบทดแทนในการผลิตเนย โกลโก้ คาร์โบไฮเดรตไตรกลีเซอไรด์ต่ำและน้ำมันที่อุดมด้วยกรดโอเลอิก โดยเอนไซม์ไลเปสมีแนวโน้มที่สามารถปรับเปลี่ยนและนำมาใช้เป็นตัวกลางสำคัญในอุตสาหกรรมน้ำมันสำหรับแปรรูปโครงสร้างไขมัน เนื่องจากการใช้เอนไซม์ที่มีความจำเพาะต้องสามารถทำงานได้สภาวะที่มีปฏิกริยาไม่รุนแรง (Rani *et al.*, 2003)

นอกจากนี้ เอนไซม์ไลเปสยังมีส่วนเกี่ยวข้องในกระบวนการผลิตเนื้อ เช่น การผลิตเนื้อปลาที่มีไขมันต่ำ โดยไขมันในเนื้อปลาจะปลดปล่อยออกระหว่างกระบวนการผลิต โดยจะเพิ่มเอนไซม์ไลเปสเข้าไปทดแทนซึ่งในขั้นตอนนี้เรียกว่า biolipolysis เอนไซม์ไลเปสจึงมีบทบาทสำคัญในกระบวนการหมัก ขั้นตอนการผลิตไส้กรอก และใช้ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของกรดไขมันที่ปลดปล่อยออกมาในระหว่างการสุก นอกจากนี้เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ยังสามารถนำผลิตนมถั่วเหลืองและการปรับปรุงกลิ่นหอม และเร่งการหมักในไวน์แอปเปิ้ล (Seitz, 1974) เนื่องจากคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลักของวัสดุชีวภาพในการผลิตเชิงอุตสาหกรรมเกษตรกรรม นอกจากนี้ยังรวมถึงไขมันด้วยและทั้งสามองค์ประกอบนี้เกี่ยวข้องกับส่วนประกอบของร่างกาย การย่อยสลาย และการดูดซึมต่างๆ

นอกจากนี้การเกิดปฏิกิริยา selective esterification ของเอนไซม์ไลเปส เป็นการหาสารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายสามารถศึกษาคุณสมบัติในมาใช้ในการสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวบริสุทธ์ (polyunsaturated fatty acid หรือ PUFA) ได้แก่ การทำบริสุทธ์ Docosahecanoic acid (DHA) และ Ecosapentaenoic acid (EPA) จากน้ำมันปลาทูน่าที่มีบทบาทสำคัญต่อการพัฒนาการของสมอง และระบบประสาทในการมองเห็นของทารกในครรภ์มารดา (Lawson and Hughes, 1988)

2.3 แหล่งของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในทางอุตสาหกรรม

แหล่งธรรมชาติที่แบคทีเรียมีความหลากหลายมากที่สุดในโลกคือ ดิน จะพบว่าสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในดินมีการทำงานที่ซับซ้อนจึงทำให้เกิดสายใยอาหาร (food web) ที่หลากหลายขึ้นอยู่กับชนิดของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดที่อาศัยอยู่ในดิน (ภาพที่ 5) เอนไซม์ในดินจะถูกสังเคราะห์ด้วยจุลินทรีย์และทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพเพื่อกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาต่างๆ เกิดกระบวนการเผาผลาญที่จะสลายสารอินทรีย์และผลิตสารประกอบที่สำคัญสำหรับจุลินทรีย์และพืช (Moreno *et al.*, 2003)



ภาพที่ 5 สายใยอาหารในดินที่เกิดจากการทำงานร่วมกันของสิ่งมีชีวิตต่างๆ

(แหล่งที่มา : Stefan *et al.*, 2018)

เอนไซม์ที่สำคัญทางอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ ได้แก่ เซลลูเลส อะไมเลส โปรตีเอส และไลเปส สามารถพบได้ทั้งในแบคทีเรีย รา หรือยีสต์บางสายพันธุ์ที่มีแหล่งอาศัยอยู่ในดิน (ตารางที่ 2-5) ซึ่ง

แบคทีเรียในดินเหล่านี้จะทำหน้าที่ปรับปรุงและกระตุ้นการสลายของสารอินทรีย์เพื่อให้มีสารอาหารและสารประกอบคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญ (Aita *et al.*, 2007) และทำให้เกิดการหมุนเวียนของแร่ธาตุ ได้แก่ วัฏจักรคาร์บอน วัฏจักรไนโตรเจน วัฏจักรฟอสฟอรัส เป็นต้น ซึ่งสามารถนำสารทุติยภูมิที่แบคทีเรียผลิตขณะเจริญไม่ว่าจะผลิตภายในเซลล์ (intracellular enzyme) หรือผลิตออกนอกเซลล์ (extracellular enzyme) ไปประยุกต์ใช้กับอุตสาหกรรมการผลิตขนมหวาน อุตสาหกรรมการผลิตเครื่องดื่ม อุตสาหกรรมการผลิตสิ่งทอ อุตสาหกรรมนม เป็นต้น



ตารางที่ 2 แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูโลสจากแหล่งดินในสถานะที่เหมาะสม

แบคทีเรีย	ค่ากิจกรรมของ เอนไซม์ (ยูนิต/มิลลิลิตร)	สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์			แหล่งที่พบ	อ้างอิง
		pH	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ระยะเวลาบ่ม (ชั่วโมง)		
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0.90					
<i>Bacillus subtilis</i>	0.90	7.0	40	48	ดิน ประเทศอินเดีย	Sethi et al. (2013)
<i>Escherichia coli</i>	0.80					
<i>Serratia marcescens</i>	0.40					
<i>Paenibacillus terrae</i>	2.08	5.5	50	60	พื้นที่กังเขตร้อน ประเทศจีน	Liang et al. (2014)
<i>Pseudomonas</i> sp.	2.56	7.0	40		โรงงานผลิตกระดาษ, ฟาร์มอ้อย,	Shaikh et al. (2013)
<i>Bacillus</i> sp.	3.50	7.5	50	96	วัสดุที่ผลิตจากไม้ ประเทศอินเดีย	
<i>Bacillus cereus</i>	103.00	6.0	25	84	ดินบริเวณซากไม้ ประเทศ แอฟริกาใต้	Nkohla et al. (2017)

ตารางที่ 3 แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากแหล่งดินในสภาวะที่เหมาะสม

แบคทีเรีย	ค่ากิจกรรมของ เอนไซม์ (ยูนิต/มิลลิลิตร)	สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์				อ้างอิง
		pH	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ระยะเวลา ปม (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น ของแป้ง (%)	
<i>Bacillus</i> ssp.	9.28	7.0	40	48	1	Vaidya and Rathore (2015) แหล่งทิ้งมันฝรั่ง ประเทศอินเดีย
<i>Bacillus</i> ssp.	7.80	6.8 - 7.2	50 - 70	72	2	Mishra and Behera (2008) ดินที่ปนเปื้อนเศษ อาหารจากครัว ประเทศอินเดีย

ตารางที่ 4 แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากแหล่งดินในสภาวะที่เหมาะสม

แบคทีเรีย	ค่ากิจกรรมของ เอนไซม์ (ยูนิต/มิลลิลิตร)	สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์				อ้างอิง
		pH	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ระยะเวลา ปม (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น ของแป้ง (%)	
<i>Bacillus</i> spp.	3.50	7.0	40	48	4	Maraki และ Tewedros campus University of Gondar, North West Ethiopia ประเทศ เอธิโอเปีย Gebreselema (2015)

ตารางที่ 3 แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากแหล่งดินในสภาวะที่เหมาะสม (ต่อ)

แบคทีเรีย	ค่ากิจกรรมของ เอนไซม์ (ยูนิต/มิลลิลิตร)	สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์				แหล่งที่พบ	อ้างอิง
		pH	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ระยะเวลา บ่ม (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น ของแป้ง (%)		
<i>Pseudomonas mendocina</i>	1.68	7.0	40	72	1	ดินที่ปนเปื้อนเศษ อาหารจากครัว, เศษ ขนมปัง, ดินบริเวณ สวนหย่อม ประเทศไทย อินเดีย	Padhiar and Kommu (2016)
<i>Bacillus subtilis</i>	1.70	7.5-8.5	40	48	-	แหล่งทิ้งมันฝรั่ง ประเทศไทยอินเดีย	Verma et al. (2011)
<i>Bacillus cereus</i>							
<i>Bacillus megaterium</i>							
<i>Bacillus sp. marini</i>	8.00	7.0	40	-	2	ดินบริเวณหมู่เกาะอิน ตามันและ นิโค บาร์ ประเทศอินเดียน	Ashwini et al. (2011)

ตารางที่ 5 แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจากแหล่งดินในสภาวะที่เหมาะสม

แบคทีเรีย	ค่ากิจกรรมของ เอนไซม์ (ยูนิต/มิลลิลิตร)	สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์			แหล่งที่พบ	อ้างอิง
		pH	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ระยะเวลาบ่ม (ชั่วโมง)		
<i>Bacillus</i> sp. B77	0.21	7.0	37-45	72	ดินบริเวณที่ปนเปื้อนนม ประเทศไทย	Dorcas and Roy (2012)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	30.00	10.0	37	48	ดิน ประเทศอินเดีย	Palsaniya <i>et al.</i> (2012)
<i>Bacillus subtilis</i>	95.00					
<i>Escherichia coli</i>	90.00					
<i>Serratia marscens</i>	35.00					
<i>Bacillus subtilis</i> NCIM 2724	3.15	8.0	40	72		
<i>Neisseria</i> ssp.	3.20	8.0-9.0	50	48	ดินบริเวณที่ปนเปื้อนนม ประเทศไทย	Bagewadi <i>et al.</i> (2011)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.95	7.0-8.0	50	72		

ตารางที่ 6 แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแหล่งดินต่างๆ ในสภาวะที่เหมาะสม

แบคทีเรีย	ค่ากิจกรรมของ เอนไซม์ (ยูนิต/มิลลิลิตร)	สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์			แหล่งที่พบ	อ้างอิง
		pH	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ระยะเวลาบ่ม (ชั่วโมง)		
<i>Pseudomonas gessardii</i>	168.70	7.0	37	48	Dharmapuri และ Salem districts ประเทศอินเดีย	Veerapagu <i>et al.</i> (2013)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4.81	9.0	30	48	ดินที่ปนเปื้อนน้ำมันจากครัว จังหวัดขอนแก่น ประเทศไทย	Boonmahome (2013)
<i>Staphylococcus spp.</i>	25.00	7.0	37	48	ดินบริเวณโรงผลิตนม ประเทศอินเดีย	Sirisha <i>et al.</i> (2010)
<i>Pseudomonas putida</i>	24.00	10.0	30	48	ธนาคารเก็บเชื้อ ประเทศออสเตรเลีย	Fatima <i>et al.</i> (2015)

2.4 บทบาทของเอนไซม์ทางอุตสาหกรรมในปัจจุบัน

เอนไซม์มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อความยั่งยืนของชีวิต เนื่องจากมีทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมี ส่งผลให้เกิดการย่อยสลายของสารอินทรีย์ต่างๆ ที่จำเป็นต้องอาศัยจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในอากาศ น้ำ และดินจึงทำให้เกิดความหลากหลายของจุลินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ รา แอคติโนมัยซิส ซึ่งสิ่งมีชีวิตเหล่านี้ล้วนเป็นแหล่งผลิตเอนไซม์ที่มีความหลากหลายและมีประโยชน์ต่ออุตสาหกรรม

จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ที่เป็นได้ทั้งกลุ่มไฮโดรไลซิสและออกซิโดซ์ ซึ่งเปรียบเสมือนเป็นการลดหรือการเผาผลาญสารอินทรีย์ต่างๆ ในธรรมชาติ แต่ปริมาณของเอนไซม์ที่ผลิตได้จะมีความแตกต่างกันขึ้นกับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสารตั้งต้นที่แตกต่างกัน เอนไซม์ที่ใช้สำหรับการผลิตเชิงพาณิชย์จะต้องมีความจำเพาะต่อสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่คัดเลือกเพื่อสนับสนุนให้จุลินทรีย์มีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด มีประโยชน์มากกว่าเมื่อเทียบกับเอนไซม์ที่ได้จากแหล่งพืชและสัตว์ เนื่องจากการใช้จุลินทรีย์ในการผลิตเอนไซม์นั้นมีต้นทุนการผลิตต่ำ สามารถอาศัยเทคนิคการตัดต่อทางพันธุกรรมได้ สามารถขยายการผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้อย่างสะดวกรวดเร็ว และวัสดุหรืออาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงยังสามารถหาได้ทั่วไปจากสภาพแวดล้อมที่มีความหลากหลายทางกายภาพและทางเคมี ด้วยเหตุนี้อุตสาหกรรมต่างๆ จึงนิยมใช้จุลินทรีย์ในการผลิตเอนไซม์ (Hasan *et al.*, 2006) เอนไซม์อุตสาหกรรมอาหาร เช่น เพคตินเนส ไลเปส แลคเตส เซลลูเลส อะไมเลส โปรตีเอส หรืออินเวอร์เตส ก็มีส่วนช่วยในการเพาะเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมเพื่อเอื้อต่อการผลิตเอนไซม์ให้มีปริมาณสูง เช่น การใช้เทคนิคการตัดต่อพันธุกรรม การใช้เทคนิค encapsulation และการใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพหรือ bioreactors ที่อาศัยเทคนิคการตรึงเอนไซม์ (immobilization enzyme) กล่าวคือ เทคนิคนี้จะอาศัยอนุภาคนาโนเป็นตัวกลางในการตรึงเอนไซม์และวัสดุหรืออนุภาคที่นำมาต้องมีรูพรุนเพื่อช่วยป้องกันมิให้เอนไซม์เสียสภาพจากความร้อนในกระบวนการผลิตต่างๆ ซึ่งนิยมใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตไวน์ แอลกอฮอล์ การหมักแอปเปิ้ลไซเดอร์ การผลิตเบียร์ การถนอมเนื้อสัตว์ และทางด้านการแพทย์ เป็นต้น

2.5 การศึกษาความหลากหลายทางสายพันธุ์ของแบคทีเรียด้วยเทคนิคชีววิทยาระดับโมเลกุล

ก่อนหน้านี้หากต้องการศึกษาความหลากหลายทางสายพันธุ์ของแบคทีเรียมักอาศัยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งเป็นวิธีที่สิ้นเปลืองทรัพยากรเป็นอย่างมากและมีข้อจำกัดในการศึกษาที่ไม่สามารถจำลองสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียได้ โดยช่วงทศวรรษที่ผ่านมาได้มีการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียโดยอาศัยเทคนิคการวิเคราะห์ในระดับอนุชีววิทยา (molecular biology หรือ cultured-independent method) เทคนิคนี้มีบทบาทสำคัญอย่างมาก เนื่องจากสามารถลดระยะเวลาในการจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียและสามารถสกัดดีเอ็นเอออกมาได้โดยตรงจากแบคทีเรีย ปัจจุบันมีวิธีการเปรียบเทียบสายพันธุ์แบคทีเรีย

เพื่อวินิจฉัยความถูกต้องของสายพันธุ์โดยการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) ส่วนใหญ่มักนิยมตรวจสอบโดยอาศัยวิธี gel electrophoresis ที่สามารถแยกสารด้วยกระแสไฟฟ้าผ่านเจล วิธีนี้จึงสามารถนำไปวิเคราะห์เชิงวิวัฒนาการของจุลินทรีย์ที่สัมพันธ์กับ ribosome RNA gene ของจุลินทรีย์ได้ สิ่งมีชีวิตประเภทโพรคาริโอตส่วนใหญ่มีขนาดของไรโบโซม 70S ประกอบด้วยหน่วยขนาดใหญ่ขนาด 50S และหน่วยขนาดเล็กขนาด 20S โดยไรโบโซมหน่วยขนาดใหญ่ประกอบด้วย 23S rRNA ที่มีขนาด 2,904 นิวคลีโอไทด์ 5S rRNA ขนาดประมาณ 120 นิวคลีโอไทด์ และโปรตีนอีก 34 ชนิด ส่วนไรโบโซมหน่วยขนาดเล็กประกอบด้วย 16S rRNA ขนาดประมาณ 1,541 นิวคลีโอไทด์ และโปรตีน 21 ชนิด (Head *et al.*, 1998)

ยีน 16S rRNA จัดเป็นยีนที่มีบริเวณอนุรักษ์สูง นิยมใช้กันแพร่หลายในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ เนื่องจากยีน 16S rRNA เป็นออร์แกนเนลล์ที่พบได้ทั่วไปในเซลล์แบคทีเรียโดยมีมัลติยีน (multigene) หรือ operon ที่กำหนดความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์แบคทีเรีย มีหน้าที่ที่แน่นอน มีขนาดใหญ่และมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมากในแต่ละวิวัฒนาการจึงง่ายต่อการจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรีย (Janda and Abbott, 2007) มีประโยชน์ทางการตรวจวิเคราะห์สายพันธุ์แบคทีเรียและวิเคราะห์เชิงวิทยาศาสตร์เฉพาะทาง ในขณะที่บริเวณแปรผันของยีน 16S rRNA ทำให้พบความหลากหลายที่เพียงพอในการออกแบบไพรเมอร์ในปฏิกิริยา PCR ที่เหมาะสมกับเงื่อนไขการทำงาน กรณีที่ยีนมีความผันแปรสูงหรือเกิดการผ่าเหล่าหรือมีวาทะชันจะทำให้ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนสูญหายไปและไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ (alignment) เนื่องจากการเปรียบเทียบข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์จำเป็นต้องเปรียบเทียบหาบริเวณที่มีความเหมือนและความต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์



บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 สถานที่เก็บข้อมูล

พื้นที่ดินเค็มในป่านาสีนวน ตำบลนาสีนวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม ประเทศไทย สถานที่ทำการทดลอง คือ หน่วยวิจัย Natural Antioxidant Innovation Research Unit (NAIRU) ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม และศูนย์เครื่องมือกลางของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

3.2 การเก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ดินเค็ม

สถานที่เก็บข้อมูล ณ พื้นที่ดินเค็มในป่านาสีนวน ตำบลนาสีนวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม ประเทศไทย เริ่มเก็บดินจำนวน 60 ไร่แรก (96,000 ตารางเมตร) ในระยะ 1 (Phase 1) จากทั้งหมด 120 ไร่ วิธีเก็บตัวอย่างดิน มีดังนี้ (กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ จาก www.doa.go.th)

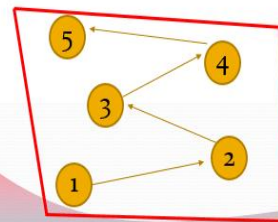
วิธีการ

- 1) แบ่งพื้นที่ออกเป็น 3 แปลงย่อย จาก 60 ไร่ แล้วกำหนดหมายเลขแปลงย่อยเหล่านั้น



Area 1 = 20 rai (20 spots)
Collect soils from 20 spots
under trees

4 zones x 5 spots = 20 spots
→ pooled soils (Soil 1)



ภาพที่ 6 ปีวิจัยที่ 1 พื้นที่เก็บดินแบ่งออกเป็น 3 แปลง แต่ละแปลงแบ่งออกเป็น 4 โซน

- 2) เดินสุ่มเก็บตัวอย่างให้ทั่วในแต่ละแปลงย่อยที่มีต้นไม้อยู่อย่างหนาแน่น แบ่งแต่ละแปลงออกเป็น 4 ส่วน ส่วนละ 5 จุด รวมเก็บตัวอย่างดินในแต่ละแปลงย่อย 20 จุด

3) การเก็บตัวอย่างดินแต่ละจุด รวม 20 จุด โดยใช้พลั่วหรือจอบขุดดินเป็นหลุม รูปคดมขวาน หรือรูปลิ้ม ลึกประมาณ 15 ซม. ใช้พลั่วแซะดินด้านหนึ่งของหลุมให้ได้ดินเป็นแผ่นหนา 2-3 ซม. ลึก 15 ซม. ตัวอย่างดินที่ได้นี้เป็นดิน 1 จุด แล้วใส่รวมกันในกระป๋องพลาสติก สำหรับไม้ผลหรือไม้ยืนต้น เก็บดินที่ความลึก 0-15 และ 40-50 ซม.

4) คลุกเคล้าดินในกระป๋องให้เข้ากัน เทลงบนผ้าพลาสติก คลุกเคล้าดินให้เข้ากันอีกครั้ง หนึ่ง กองดินเป็นรูปฝาชี แบ่งดินออกเป็น 4 ส่วน เก็บดิน 4 ส่วนนี้แยกไว้ 4 ถัง สำหรับใช้ในการวิเคราะห์

5) ถาดดินเปียก ตากในที่ร่ม แล้วบดให้ละเอียดเก็บใส่ถุง และเขียนหมายเลขกำกับไว้

6) เก็บดินไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะทำการวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป ทำการวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพของดินโดยการวัดค่าการนำไฟฟ้าและค่าความเป็นกรด-ด่าง

3.3 การแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์สำคัญทางอุตสาหกรรม

ซึ่งดินมา 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 90 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันโดยเครื่อง vortex จากนั้นนำมาเจือจางด้วย 0.85% NaCl ปลอดเชื้อให้ได้สารละลายเจือจางหลายระดับ 10^{-2} ถึง 10^{-6} ก่อนปิเปตสารแขวนลอยปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแต่ละชนิดแล้วเกลี่ยให้ทั่วจานเพาะเชื้อด้วยวิธีเกลี่ยเชื้อตามคุณสมบัติของแบคทีเรียที่ต้องการศึกษา ดังต่อไปนี้

3.3.1 เอนไซม์เซลลูเลส

1) การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

เกลี่ยเชื้อแบคทีเรียลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง carboxymethyl cellulose (CMC) agar (กรัม/100 มิลลิลิตร); 1.0 CMC, 0.1 NaNO_3 , 0.1 KCl, 0.05 MgSO_4 , 0.05 yeast extract, 0.1 glucose และ 1.5% agar บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม 0.1% congo red ให้ทั่วจานเพาะเชื้อ ทิ้งไว้ 15 นาที แล้วจึงล้างด้วยสารละลาย 1 โมลาร์ NaCl (Apun *et al.*, 2000) สังเกตบริเวณส่วนใสรอบๆ โคโลนีที่ย่อย CMC แสดงว่าสร้างเอนไซม์เซลลูเลส จากนั้น เก็บโคโลนีเหล่านั้นมาทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีซีดเชื้อ จากนั้นศึกษาลักษณะของโคโลนี ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ สัณฐานรูปร่างการจัดเรียงตัวและชนิดของแกรมแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 1,000 เท่า) เก็บไอโซเลทแบคทีเรียบริสุทธิ์มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria Bertani (LB) (กรัม/ลิตร); 10.0 tryptone, 5.0 yeast extract, 5.0 NaCl และ 15.0 agar (pH 7.2) เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ใช้ไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อแตะเชื้อมาทำ point inoculation บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน สังเกตเคลียร์โซนรอบๆ โคโลนี วัดรัศมีของบริเวณใสและรัศมีของโคโลนีเพื่อคำนวณหาค่า Halo : Colony ratios ดัง

สูตรต่อไปนี้ Halo : Colony ratios = รัศมีบริเวณวงใสรอบโคโลนี/รัศมีโคโลนี ไอโซเลทที่มีค่า Halo : Colony ratios สูงที่สุด 3 อันดับแรก แสดงว่ามีกิจกรรมเอนไซม์ดีที่สุด (Nwanyanwu *et al.*, 2015) จากนั้นเก็บเชื้อไว้ทำการทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ในอาหารเหลวต่อไป

2) การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

เลี้ยงเชื้อที่มีค่า Halo : Colony ratio สูงที่สุด 3 อันดับแรก ปรับความเข้มข้นด้วยอาหารเหลวให้มีเชื้อเริ่มต้น 10^8 โคโลนีฟอร์มมิงยูนิต/มิลลิลิตร เทียบกับ 0.5 McFarland (Franklin *et al.*, 2012) เพื่อทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ประกอบด้วย (กรัม/ลิตร); 0.1 CMC, 0.5 glucose, 0.75 peptone, 0.01 FeSO₄, 0.5 KH₂PO₄ และ 0.5 MgSO₄ ปริมาตร 30 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง เพื่อเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลส จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000g เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บส่วนใส (extracellular enzyme) เพื่อทำการศึกษาคต่อไป

สำหรับการทดสอบหากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้นั้น สามารถทำการทดสอบโดยปิเปตส่วนใสของแบคทีเรียที่มีค่า Halo : Colony ratios สูงที่สุด 3 อันดับแรก และทดสอบตามวิธีที่ดัดแปลงจากรายงานก่อนหน้าของ (Ghose, 1987) กล่าวคือ ผสมส่วนใสที่เป็นแหล่งของเอนไซม์ (crude enzyme) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร กับ 0.3 มิลลิลิตร ของ 1% carboxymethyl cellulose (CMC) ที่ละลายในสารละลาย 50 มิลลิโมลาร์ sodium phosphate buffer (pH 7) จากนั้นบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส จากนั้นหยุดการทดลองโดยการเติมสาร DNS reagent ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที เพื่อทำให้เกิดสี วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 575 นาโนเมตร (Miller, 1959) โดยมีน้ำกลั่นปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร เป็นแบล็ก และมิชชุดควบคุมเป็น crude enzyme extract ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ 1 unit cellulase activity เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ผลิต 1 μmol glucose ต่อนาที โดยคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส และคำนวณหาค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์จากสูตรการคำนวณโดยอ้างอิงวิธีของ Haq *et al.* (2003)

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิต/มิลลิลิตร)} = \frac{\text{ปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์} \times \text{ค่าการเจือจาง}}{1,000 \times \text{มวลโมเลกุลกลูโคส} \times \text{เวลา} \times \text{ปริมาตรเอนไซม์}}$$

ค่ากิจกรรมของเอนไซม์จำเพาะ (ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน)

$$= \frac{\text{กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิต/มิลลิลิตร)}}{\text{ความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)}}$$

3.3.2 เอนไซม์อะไมเลส

1) การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

เกลี่ยเชื้อแบคทีเรียลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง starch agar (กรัม/ลิตร); 3.0 beef extract, 10.0 starch และ 15.0 agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นเติม 0.3% I₂ ที่ผสมกับ 0.6% KI solution ให้ท่วมจานเพาะเชื้อและสังเกตบริเวณส่วนใสรอบๆ โคลินี้ หากไอโซเลทใดมีบริเวณส่วนใสรอบๆ โคลินี้ ปรากฏขึ้นแสดงว่าไอโซเลทนั้นๆ สามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลสเพื่อทำหน้าที่ในการย่อยแป้งให้ได้น้ำตาลซึ่งไม่ทำปฏิกิริยา กับโคโลนิเหล่านั้นมาทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีซีดเชื้อ จากนั้นศึกษาลักษณะของโคโลนิ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ สัณฐานรูปร่างการจัดเรียงตัวและชนิดของแกรมแบคทีเรีย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 1,000 เท่า) เก็บไอโซเลทแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria Bertani (LB) (กรัม/ลิตร); 10.0 tryptone, 5.0 yeast extract, 5.0 NaCl และ 15.0 agar (pH 7.2) เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ใช้ไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อแตะเชื้อมาทำ point inoculation บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน สังเกตเคลียร์โซนรอบๆ โคลินี้ แล้วทำการวัดรัศมีของบริเวณใสและรัศมีของโคโลนิ เพื่อนำมาคำนวณหาค่า Halo : Colony ratios ดังสูตรต่อไปนี้ Halo : Colony ratios = รัศมีบริเวณใสรอบโคโลนิ/รัศมีโคโลนิ Halo : Colony ratios สูงสุด ไอโซเลทที่มีค่า Halo : Colony ratios สูงที่สุด 3 อันดับแรก แสดงว่ามีกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสที่สุด (Nwanyanwu *et al.*, 2015) เก็บเชื้อไว้ทำการทดลองในอาหารเหลวต่อไป

2) การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่มีค่า Halo : Colony ratios สูงที่สุด 3 อันดับแรก ปรับความขุ่นเชื้อด้วยอาหารเหลวให้เชื่อมีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 10⁸ โคลินี้ฟอर्मมิงยูนิต/มิลลิลิตร เทียบกับ 0.5 McFarland (Franklin *et al.*, 2012) เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลวโดยดัดแปลงจากวิธีของ Ashwini *et al.* (2011) ประกอบด้วย (กรัม/ลิตร); 10.0 starch soluble, 10.0 peptone, 20.0 yeast extract, 0.05 KH₂PO₄, 0.015 MnCl₂·4H₂O, 0.25 MgSO₄·7H₂O, 0.05 CaCl₂·2H₂O และ 0.01 FeSO₄·7H₂O ปริมาตร 30 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000g เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใส (extracellular enzyme) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทดสอบหากิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสจากแบคทีเรียไอโซเลทที่คัดเลือกได้จากค่า Halo : Colony

ratios สูงที่สุด 3 อันดับแรก โดยปิเปต 0.2 มิลลิลิตร ของส่วนใสที่เป็นแหล่งของ extracellular enzyme ผสมกับ 1% สารละลายแป้งปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อเหนี่ยวนำให้เอนไซม์ทำงาน จากนั้นหยุดการทดลองโดยการเติมสาร DNS reagent ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที เพื่อทำให้เกิดสี วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 575 นาโนเมตร โดยมีน้ำกลั่นปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร เป็นแบล็ก และมิชชุดควบคุมเป็น crude enzyme extract ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ 1 unit amylase activity เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ผลิต 1 μmol glucose ต่อนาที โดย คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส โดยอ้างอิงจาก Haq *et al.* (2003) และคำนวณหาค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ จากสูตร

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิต/มิลลิลิตร)} = \frac{\text{ปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์} \times \text{ค่าการเจือจาง}}{1,000 \times \text{มวลโมเลกุลกลูโคส} \times \text{เวลา} \times \text{ปริมาตรเอนไซม์}}$$

$$\begin{aligned} \text{ค่ากิจกรรมของเอนไซม์จำเพาะ (ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน)} \\ = \frac{\text{กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิต/มิลลิลิตร)}}{\text{ความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)}} \end{aligned}$$

3.3.3 เอนไซม์โปรตีเอส

1) การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

เกลี่ยเชื้อแบคทีเรียลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง skim milk ประกอบด้วย (กรัม/100 มิลลิลิตร); 1.0 tryptone, 0.5 peptone, 0.3 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2.0 K_2HPO_4 , 0.2 MgSO_4 , 1.0 casein และ 15.0 agar (pH 7.0) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตการเกิดเคลียร์โซนรอบๆ โคลินี่ แสดงว่าไฮไลเทเหล่านั้นสร้างเอนไซม์โปรตีเอสที่ย่อยเคซีนในอาหารแข็งได้ จากนั้นเก็บโคลินี่เหล่านั้นมาทำให้บริสุทธิ์บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีขีดเชื้อ ศึกษา ลักษณะของโคลินี่ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ สัณฐานรูปร่างการจัดเรียงตัวและชนิดของแกรมแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 1,000 เท่า) เก็บไฮไลเทแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria Bertani (LB) (กรัม/ลิตร); 10.0 tryptone, 5.0 yeast extract, 5.0 NaCl และ 15.0 agar (pH 7.2) เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ใช้ไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อแตะเชื้อมาทำ point inoculation บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน สังเกตเคลียร์โซนรอบๆ โคลินี่ แล้วทำการวัดรัศมีของบริเวณใสและรัศมีของโคลินี่ เพื่อนำมาคำนวณหาค่า Halo : Colony

ratios ดังสูตรต่อไปนี้ Halo : Colony ratios = รัศมีบริเวณวงใสรอบโคโลนี/รัศมีโคโลนี Halo : Colony ratios สูงสุด Haq *et al.* (2003) ไอโซเลทที่มีค่า Halo : Colony ratios สูงที่สุด 3 อันดับแรก แสดงว่ามีกิจกรรมเอนไซม์โปรตีเอสดีที่สุด (Nwanyanwu *et al.*, 2015) เก็บเชื้อไว้ทำการทดลองในอาหารเหลวต่อไป

2) การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตโปรตีเอสในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่มีค่า Halo : Colony ratios สูงที่สุด 3 อันดับแรก ปรับความเข้มข้นด้วยอาหารเหลวให้เชื้อมีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 10^8 โคโลนีฟอร์มมิ่งยูนิต/มิลลิลิตร เทียบกับ 0.5 McFarland (Franklin *et al.*, 2012) ที่ประกอบไปด้วย (กรัม/ลิตร); 10.0 tryptone, 5.0 peptone, 3.0 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2.0 K_2HPO_4 , 0.2 MgSO_4 , 10.0 casein ปริมาตร 30 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000g เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใส (extracellular enzyme) สำหรับการทดสอบหากิจกรรมเอนไซม์โปรตีเอสจากแบคทีเรียไอโซเลทที่คัดเลือกได้จากค่า Halo : Colony ratios สูงที่สุด 3 อันดับแรก ดัดแปลงวิธีของ Suganthi *et al.* (2013) โดยมีส่วนผสมประกอบไปด้วย 0.5 มิลลิลิตร crude enzyme ผสมกับ 1% เคซีน ใน 50 มิลลิโมลาร์ Potassium phosphate buffer pH 7.5 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อเหนี่ยวนำให้เอนไซม์ทำงาน หยุดการทดลองโดยการเติม 110 มิลลิโมลาร์ trichloroacetic acid (TCA) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นปิเปตส่วนใสของสารผสมมาปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.5 โมลาร์ Sodium carbonate solution ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และสารละลาย Folin's reagent ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร โดยมีน้ำกลั่นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เป็นแบล็งก์ และมีชุดควบคุมเป็นส่วนใสของแบคทีเรียไอโซเลทปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ 1 unit protease activity เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ผลิต $1 \mu\text{mol}$ tyrosine ต่อนาที โดยคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสโดยอ้างอิงจากรายงานก่อนหน้าของ Cupp-Enyard (2008) และคำนวณหาค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ จากสูตรดังต่อไปนี้

ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิต/มิลลิลิตร)

$$= \frac{\text{ปริมาณของไทโรซีนที่ถูกปลดปล่อยออกมา (ไมโครโมลาร์)} \times \text{ปริมาตรทั้งหมด (มิลลิลิตร)}}{\text{ค่าเจือจาง}}$$

$$\frac{\text{ปริมาตรเอนไซม์ที่ใช้ในการทดลอง (มิลลิลิตร)} \times \text{เวลาที่ใช้ในการบ่ม (นาที)} \times \text{ปริมาตรที่ใช้ในคิวเวท (มิลลิลิตร)}}{\text{ค่าเจือจาง}}$$

$$\text{ค่ากิจกรรมของเอนไซม์จำเพาะ (ยูนิต/มิลลิลิตรกรัมโปรตีน)} = \frac{\text{กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)}}{\text{ความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมด (มิลลิลิตรต่อมิลลิลิตร)}}$$

3.3.4 เอนไซม์ไลเปส

1) การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

เกลี่ยเชื้อแบคทีเรียลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง tributyrin agar (Sirisha and Rajasekar, 2010) ที่ประกอบไปด้วย (กรัม/100 มิลลิลิตร); 0.5% (w/v) peptone, 0.3% (w/v) yeast extract, 1% (v/v) tributyrin และ 1.5% agar, pH 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตเคลียร์โซนรอบๆ โคลนิน แสดงว่าสร้างไลเปสที่ย่อย tributyrin จากนั้นเก็บโคลนินั้นๆ มาทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีขีดเชื้อ ศึกษาลักษณะของโคลนินั้น ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ สัณฐานรูปร่างการจัดเรียงตัวและชนิดของแกรมแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 1,000 เท่า) เก็บไอโซเลทแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria Bertani (LB) (กรัม/ลิตร); 10.0 tryptone, 5.0 yeast extract, 5.0 NaCl และ 15.0 agar (pH 7.2) เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ใช้ไม้จิ้มฟันแตะเชื้อมาทำ point inoculation บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน สังเกตเคลียร์โซนรอบๆ โคลนิน แล้วทำการวัดรัศมีของบริเวณใสและรัศมีของโคลนิน เพื่อนำมาคำนวณหาค่า Halo : Colony ratios ดังสูตรต่อไปนี้ Halo : Colony ratios = รัศมีบริเวณวงใสรอบโคลนิน/รัศมีโคลนิน Halo : Colony ratios สูงสุด ไอโซเลทที่มีค่า Halo : Colony ratios สูงที่สุด 3 อันดับแรก แสดงว่ามีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสดีที่สุด (Nwanyanwu *et al.*, 2015) เก็บเชื้อไว้ทำการทดลองในอาหารเหลวต่อไป

2) การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตไลเปสในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่มีค่า Halo : Colony ratios สูงที่สุด 3 อันดับแรก ปรับความขุ่นเชื้อด้วยอาหารเหลวให้เชื่อมีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 10^6 โคลนินฟอรัมมิงยูนิต/มิลลิลิตร เทียบกับ 0.5 McFarland (Franklin *et al.*, 2012) อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ประกอบไปด้วย (กรัม/100 มิลลิลิตร); 0.2 peptone, 0.1 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0.25 NaCl, 0.04 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.04 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.0 olive oil และ 2% (V/V) tween 80 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37

องศาเซลเซียส เวลาที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000g เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วน supernatant (extracellular enzyme) จากนั้นหา กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสตัดแปลงวิธีของ Winkler and Stuckmann (Winkler and Stuckmann, 1979) โดยผสมสารตั้งต้น para-nitrophenyl palmitate (pNPP) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมกับ 300 ไมโครลิตร ของเอนไซม์ (cell-free crude enzyme) ใน 0.05 โมลาร์ Tris-Cl buffer pH 7.0 ปริมาตรรวม 1 มิลลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อเหนี่ยวนำ ให้เอนไซม์ทำงาน วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร โดยมีน้ำกลั่นปริมาตร 0.5 มิลลิตร ผสมกับ สารละลายบัฟเฟอร์ปริมาตร 0.5 มิลลิตร เป็นแบล็ก และมีชุดควบคุมเป็นส่วนใสของแบคทีเรียไอโซเลทปริมาตร 0.5 มิลลิตร ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ปริมาตร 0.5 มิลลิตร คำนวณกิจกรรมของ เอนไซม์ 1 unit lipase activity เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ผลิต 1 μmol p-nitrophenol ต่อนาที ซึ่ง มีค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสงต่อโมลาร์คือ $15,000 \text{ cm}^2 \text{ mg}^{-1}$ (Winkler and Stuckmann, 1979) โดยคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส และคำนวณหาค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ตั้งสูตร ที่กล่าวไว้ ซึ่งมีกราฟมาตรฐานของ p-nitrophenol เป็นแหล่งอ้างอิง

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส} = \frac{\text{ปริมาณของ p-nitrophenol} \times \text{ปริมาตรรวมของปฏิกิริยา (มิลลิเมตร)}}{\text{ระยะเวลาการบ่ม} \times \text{ค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสงต่อโมลาร์} \times \text{ปริมาตร เอนไซม์ (นาที)}} \quad \begin{array}{l} \text{สารละลาย} \\ \text{(มิลลิเมตร)} \end{array}$$

$$\text{ค่ากิจกรรมของเอนไซม์จำเพาะ} = \frac{\text{กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิเมตร)}}{\text{ความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อมิลลิเมตร)}} \quad \begin{array}{l} \text{(ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน)} \end{array}$$

3.4 การจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียโดยวิธี PCR-based 16S rRNA gene

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์จาก 20% glycerol stock ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 1 มิลลิตร ข้ามคืนเพื่อการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ โดยใช้ Bacterial Genomic DNA extraction kit (Vivantis, Malaysia) เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย 16S rRNA gene จากจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์สากล (Wang *et al.*, 1996) Forward primer คือ 27F 5'-GAGAGTTTGATTCTGGCTCAG-3' และ Reverse primer คือ 1524R 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3' เทคนิค PCR 1 ปฏิบัติการมีปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย จีโนมิกดีเอ็นเอความเข้มข้น 0.5 นาโนกรัม สารละลาย 1X Master Mix Buffer A 500 มิลลิโมลาร์ KCl, 100 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl (pH 9.1), 0.1% TritonTMX-100, 200 มิลลิโมลาร์

dNTP, 1.5 มิลลิโมลาร์ MgCl₂ 0.2 ไมโครโมลาร์ forward and reverse primer, 0.005 U Taq DNA Polymerase และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจนได้ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ใช้เครื่อง PCR thermocycler (ThermoScientific Hybaid Px2) ในการเพิ่มจำนวน 16S rRNA gene ซึ่งมีสถานะดังนี้ ขั้นตอนการแยกสาย DNA สายคู่ออกจากกัน (denaturation) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที 1 รอบ ตั้งจำนวนรอบ 32 รอบ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 45 วินาที ขั้นตอนไพรเมอร์จับดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส 45 วินาที การสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที และเพิ่มจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์สุดท้ายที่ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที และเก็บ PCR product ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยเตรียม 0.8% agarose gel ละลายใน 1X TBE buffer pH 8.0 ปริมาตร 40 หรือ 100 มิลลิลิตร ด้วยความร้อนจากนั้นทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เติมสี SYBR Safe dye (Invitrogen) ในอัตราส่วน 0.5 ไมโครลิตร/สารละลายเจล 40 มิลลิลิตร เขย่าและผสมในสารละลายเจลโดยทั่วแล้วเทเจลลงในถาดเจล (gel chamber) ทิ้งให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องผสมสารละลายจีโนมิกดีเอ็นเอ 1 ไมโครกรัม กับ 6X Loading dye ในอัตราส่วน 2:1 โดยปริมาตร ใช้ lambda DNA 100 นาโนกรัม เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานเมื่อเทียบขนาดดีเอ็นเอใช้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ไฟฟ้า 80 โวลต์เป็นเวลา 30 นาที ตรวจแถบดีเอ็นเอผ่านเครื่อง Gel documentation (SYNGENE) สกัด PCR product บริสุทธิ์โดยใช้ PCR purification kit (Vivantis, Malaysia) จากนั้นส่ง PCR product ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท First BASE Co. Ltd. (ประเทศมาเลเซีย) วิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลว่ามีค่าความเหมือนหรือคล้ายคลึงกับดีเอ็นเอของแบคทีเรียชนิดใดในฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม BLAST (Basic Local Alignment Search Tools) จากฐานข้อมูล NCBI (Altschul *et al.*, 1990) โดยเลือกเชื้อที่มีค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนสูงสุด (% Identity) ผลของการจัดลำดับเบส partial 16S rRNA จะถูกนำไปสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วยวิธี Maximum Likelihood method ของ Tamura-Nei model (Tamura and Nei, 1993) โดยใช้โปรแกรม MEGA7 (www.megasoftware.net) Bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ

3.5 การหาปริมาณของโปรตีนและการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์

3.5.1 การเตรียม extracellular crude enzyme

เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่กระตุ้นหรือเหนี่ยวนำการเอนไซม์โดยการเติมสารตั้งต้นลงไปตามที่ได้กล่าวไว้ในบททดลองหากิจกรรมที่ต้องการของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาที่ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด ปั่นเหวี่ยงเชื้อที่ 10,000g ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสมากรองผ่านเมมเบรน 0.2 ไมโครเมตร เพื่อทำให้ส่วนใส

ปราศจากเชื้อแบคทีเรีย จากนั้นนำส่วนใสไปทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้ Ultracentrifuge protein concentrator (Molecular weight cut-off 10 kDa) จากนั้นนำไปหาปริมาณโปรตีนก่อนที่จะนำไปใช้ทดสอบกิจกรรมของ extracellular crude enzyme

3.5.2 การหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry's method

โดยใช้วิธี Lowry's method (Lowry *et al.*, 1951) นำตัวอย่าง crude enzyme 200 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย Lowry's solution 1.0 มิลลิลิตร แล้วเขย่าหรือ vortex หลอด Eppendorf tube และตั้งที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จากนั้นจึงเติม Folin's reagent 0.1 มิลลิลิตร แล้วรีบเขย่าหลอดทันทีอย่างแรง หรือ vortex และตั้งที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร โดยเครื่อง spectrophotometer คำนวณหาปริมาณโปรตีน โดยอาศัยกราฟมาตรฐานของ Bovine Serum Albumin (BSA จาก stock solution 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) โดยเจือจางให้มีปริมาณโปรตีนมีความเข้มข้น 0 25 50 100 150 และ 200 ไมโครกรัม ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.5.3 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์

นำ extracellular crude enzyme ไปทดสอบหากิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธีที่กล่าวไว้ข้างต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่นำส่วนใสของเชื้อมาทดสอบ คำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 1 unit enzyme activity เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ผลิต 1 μmol ของผลิตภัณฑ์ต่อนาที

3.6 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์

3.6.1 หา pH ที่เหมาะสม

นำ crude extract ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากการหากิจกรรมสูงสุดของเอนไซม์แต่ละชนิดที่ผ่านมา บ่มโดยแปรผันกับบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH ตั้งแต่ 3 4 5 6 7 8 9 และ 10 กับ 1% สารตั้งต้นของแต่ละเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำการทดลอง 3 ซ้ำ คำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 1 unit enzyme activity เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ผลิต 1 μmol ของผลิตภัณฑ์ต่อนาที ดังที่เคยทำมา

3.6.2 หาอุณหภูมิที่เหมาะสม

นำ crude extract ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากการหากิจกรรมสูงสุดของเอนไซม์แต่ละชนิดที่ผ่านมา โดยควบคุม pH ที่เหมาะสมตามผลการทดลองข้อ 3.6.1 ที่ผ่านมา บ่มโดยแปรผันที่อุณหภูมิ 4 25 35 45 55 65 75 85 และ 95 องศาเซลเซียส บ่มกับ 1% สารตั้งต้นของแต่ละเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมเป็นเวลา 30 นาที ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และคำนวณหาค่า

กิจกรรมของเอนไซม์ 1 unit enzyme activity เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ผลิต 1 μmol ของผลิตภัณฑ์ต่อนาที ดังที่เคยทำมา

3.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยดำเนินการในรูปแบบของการวิเคราะห์ One-Way Analysis Of Variance (One-way ANOVA) ตามวิธี Duncan Multiple Range's Test อาศัยโปรแกรม SPSS Statistics Ver. 17.0 แสดงผลในค่า mean \pm SD ผลการทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อ $p < 0.05$



บทที่ 4

ผลการทดลองและการอภิปรายผลการทดลอง

4.1 การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส อะไมเลส โปรตีเอส และไลเปส

ในประเทศไทยโดยเฉพาะภาคตะวันออกเฉียงเหนือมักประสบปัญหาดินเค็มที่แพร่กระจายอยู่ทั่วทุกพื้นที่ในภาค ซึ่งระดับความเค็มจะมีตั้งแต่เค็มเล็กน้อยกระทั่งเค็มมากแล้วแต่พื้นที่ส่งผลต่อให้เกษตรกรได้ผลผลิตน้อยลง วิธีการสกัดหาค่าความเค็มของดินสามารถทำได้หลายวิธีแต่วิธีที่ได้รับความนิยมมากที่สุดคือ การวัดค่าการนำไฟฟ้าของดิน (Electrical conductivity, EC) มีหน่วยการวัดเป็น ไมโครซีเมนส์/เซนติเมตร ซึ่งค่าการนำไฟฟ้าของดินมีค่าตั้งแต่ 2-18 ไมโครซีเมนส์/เซนติเมตร โดยตั้งแต่ 4 ไมโครซีเมนส์/เซนติเมตร มีความสัมพันธ์กับร้อยละความเค็มของดินและเริ่มมีผลต่อการเจริญของพืชที่เจริญในบริเวณเหล่านั้น (US Salinity Laboratory Staff, 1954)

แบคทีเรียที่พบในดินมักมีความหลากหลายทางสายพันธุ์และหน้าที่ ปานาสีนวนถือเป็นป่าที่ค่อนข้างมีความอุดมสมบูรณ์จัดเป็นบริเวณดินเค็ม จึงทำให้สามารถพบจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในการนำมาประยุกต์ใช้เชิงอุตสาหกรรม จากการเก็บตัวอย่างดินบริเวณต่างๆ ทั้งหมด 14 จุด ในปานาสีนวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม ผู้วิจัยทำการวัดค่าการนำไฟฟ้าซึ่งมีความสัมพันธ์กับค่าความเค็มและค่า pH ของสารละลายดิน พบว่าบริเวณปานาสีนวนส่วนใหญ่มีค่าการนำไฟฟ้าระหว่าง 2-18 ไมโครซีเมนส์/เซนติเมตร (ตารางที่ 6) หากค่าการนำไฟฟ้ามีค่าเท่ากับ 2 ไมโครซีเมนส์/เซนติเมตร หรือมากกว่าจัดว่าเป็นดินเค็มและเริ่มมีผลกระทบต่อผลการเจริญของพืช ส่งผลให้พืชที่เจริญบริเวณดังกล่าวเกิดความเครียดทำให้พืชผลิตก๊าซเอทิลีนมากขึ้นส่งผลให้พืชเร่งการหลุดร่วงของใบและกลีบ ทำให้ได้ผลผลิตน้อยและส่งผลกระทบต่อเกษตรกร จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าดินแต่ละจุดมีความหลากหลายของพืชที่เจริญอยู่รอบๆ และแหล่งดินแต่ละจุดมีค่าความเค็มที่แตกต่างกันไปทำให้พบจุลินทรีย์ที่หลากหลาย ข้อดีของแบคทีเรียในดิน คือ สามารถเร่งการย่อยสลายของอินทรีย์วัตถุตรึงแร่ธาตุในดินและอากาศ แต่ในขณะเดียวกันก็สามารถทำให้เกิดโรคในพืชได้ และหากนำไปศึกษาหาความสามารถในการผลิตเอนไซม์อุตสาหกรรมก็น่าจะพบความหลากหลายของเอนไซม์ที่จุลินทรีย์เหล่านี้ผลิตได้

ตารางที่ 7 ลักษณะสิ่งแวดล้อมโดยรวม ค่าการนำไฟฟ้า และค่า pH ของดินบริเวณป่าสนวน อำเภออินทรวรชัย จังหวัดมหาสารคาม ประเทศไทย

จุดดินที่	พิกัด	ลักษณะดิน สัติน ต้นไม้ สิ่งแวดล้อม	ค่าความนำไฟฟ้า (ไมโครซีเมนส์/เซนติเมตร)	ร้อยละความเค็ม ในดิน (%)	ระดับความ เค็มในดิน	pH
1.1	N 16 20 17.945, E 103 12 14.731	ใต้ต้นสะเดา มีต้นขี้เหล็กอยู่ ใกล้ๆ	3.62	0.14	เค็มเล็กน้อย	8.69
1.2	N 16 20 17.945, E 103 12 14.731	ใต้ต้นสมอไทย ต้นตอง และพยอม ปลวก	1.99	<0.10	ไม่เค็ม	7.72
1.3	N 16 20 6.619, E 103 11 0.985	-	2.23	0.10	เค็มเล็กน้อย	7.06
1.4	N 16 20 23.547, E 103 12 35.244	ตระกูลลี้ก พยอมปลวก	2.09	0.10	เค็มเล็กน้อย	6.40
2.1	N 16 20 36.882, E 103 12 32.315	ดินโล่งแจ้ง พบต้นสาบแร้งสาบ กาเจริญอยู่รอบๆ	2.88	0.14	เค็มเล็กน้อย	6.27
2.2	N 16 20 36.863, E 103 12 32.416	ป่าสะแบง	2.77	0.14	เค็มเล็กน้อย	5.77

ตารางที่ 6 ลักษณะสิ่งแวดล้อมโดยรอบ ค่าการนำไฟฟ้า และค่า pH ของดินบริเวณป่าสนวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม ประเทศไทย (ต่อ)

จุดดินที่	พิกัด	ลักษณะดิน สัติน ต้นไม้ สิ่งแวดล้อม	ค่าความนำไฟฟ้า (ไมโครซีเมนส์/เซนติเมตร)	ร้อยละความ เค็มในดิน (%)	ระดับความ เค็มในดิน	pH
2.3	N 16 19 39.152, E 103 12 33.655	ใต้ต้นยูคาลิปตัส ใต้ต้นทับทิม	18.4	>0.70	เค็มมากที่สุด	4.49
2.4	N 16 20 37.157, E 103 12 33.579	ใต้ต้นหมากผีผวน	2.41	0.12	เค็มเล็กน้อย	5.39
3.1	N 16 20 36.44, E 103 12 34.072	ใต้ต้นเมยราบ ลักษณะเป็นดินเหนียว ในวงน้ำเก่า	2.34	0.10	เค็มเล็กน้อย	5.66
3.2	N 16 20 35.406, E 103 12 35.157	หนามแดง (ลักษณะ : หนามใหญ่) ดัดทางเดิน	2.24	0.10	เค็มเล็กน้อย	5.46
3.3	N 16 20 35.405, E 103 12 35.154	ใกล้ต้นพอก	2.63	0.13	เค็มเล็กน้อย	5.40
3.4	N 16 20 35.425, E 103 12 35.178	ใต้ต้นครก	2.42	0.12	เค็มเล็กน้อย	5.26

ตารางที่ 6 ลักษณะสิ่งแวดล้อมโดยรวม ค่าการนำไฟฟ้า และค่า pH ของดินบริเวณป่าสนวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม ประเทศไทย (ต่อ)

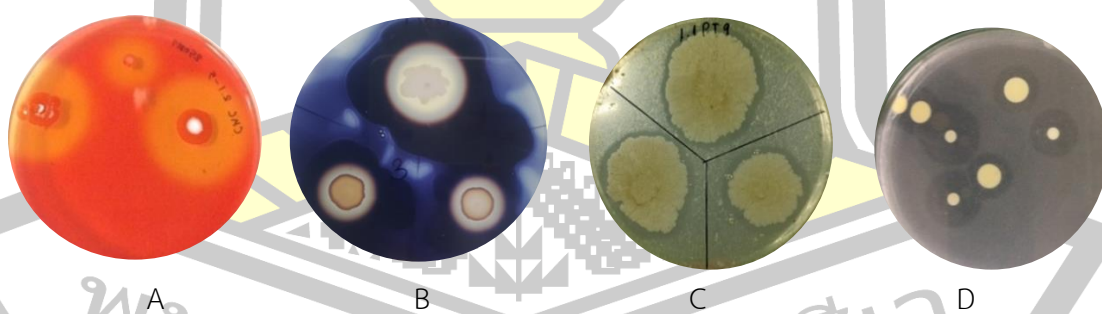
จุดดินที่	พิกัด	ลักษณะดิน สิติน ต้นไม้ สิ่งแวดล้อม	ค่าความนำไฟฟ้า (ไมโครซีเมนส์/เซนติเมตร)	ร้อยละความ เค็มในดิน (%)	ระดับความ เค็ม	pH
3.5	N 16 20 36, E 103 12 36	บริเวณที่เกิดโคลงเกิด (ขุดลึก 15 cm)	2.35	0.10	เค็มเล็กน้อย	5.39
3.6	N 16 20 36, E 103 12 36	ผิวดินที่พบเห็ดโคลงเจริญ	3.02	0.14	เค็มเล็กน้อย	5.25

ที่มา : มนัสชนก โยชนชัยสาร (2560)

4.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส อะไมเลส โปรตีเอส และไลเปส ที่แยกได้จากดินในพื้นที่ป่านาสีนวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม ประเทศไทย

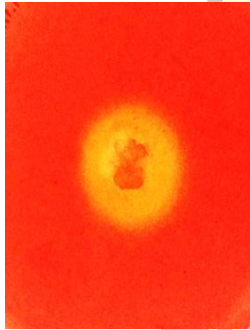
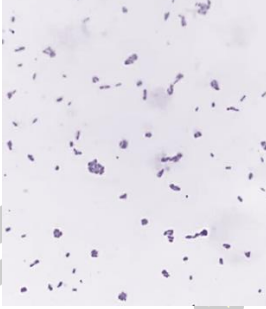
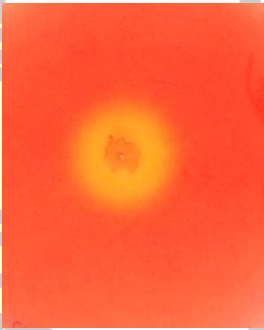
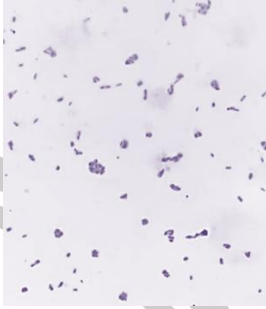
คัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อุตสาหกรรมจากตัวอย่างดินบริเวณพื้นที่ป่านาสีนวน โดยคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหารแข็งคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (CMC agar) บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสบนอาหารแข็ง starch agar บ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสบนอาหารแข็ง skim milk บ่มเป็นเวลา 48 และ แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสบนอาหารแข็ง tributyrin บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อุตสาหกรรมจะสร้างบริเวณส่วนใสรอบๆ โคลนึบนอาหารแข็ง นั้นแสดงว่าไอโซเลทเหล่านั้นมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์มาย่อยสารตั้งต้นบนอาหารทั้ง 4 ชนิด (ภาพที่ 7)

ผลความสามารถเบื้องต้นในการผลิตเอนไซม์บนอาหารแข็งที่มีสารตั้งต้นต่างๆ พบจำนวนไอโซเลทของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส อะไมเลส โปรตีเอส และไลเปส ทั้งหมด 7 32 41 และ 35 ไอโซเลท ตามลำดับ รวมทั้งสิ้น 115 ไอโซเลท ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลติกจากตัวอย่างดินบริเวณพื้นที่ป่านาสีนวน จำนวน 14 จุด จากนั้นทำการศึกษา ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ทุกไอโซเลทด้วยวิธีการสังเกตการติดสีจากการย้อมแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า รวมถึงสังเกตลักษณะของโคโลนีที่สังเกตได้ (ตารางที่ 7-11)

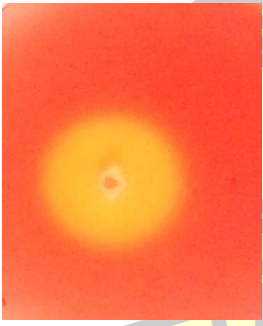
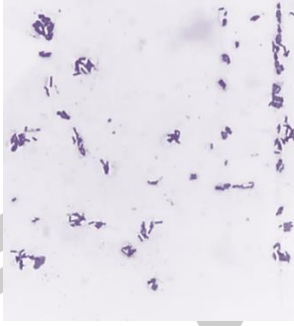
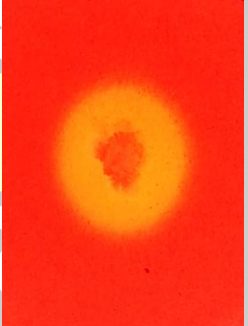
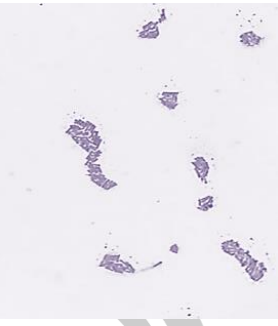


ภาพที่ 7 แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์บนอาหารแข็งที่มีสารตั้งต้นต่างกัน (A) แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหารแข็ง CMC (B) แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสบนอาหารแข็ง starch agar (C) แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสบนอาหารแข็ง skim milk และ (D) แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสบนอาหารแข็ง tributyrin

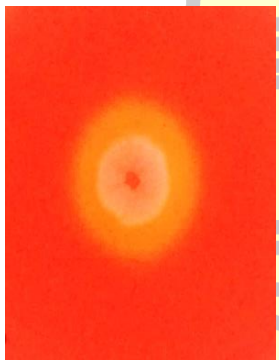
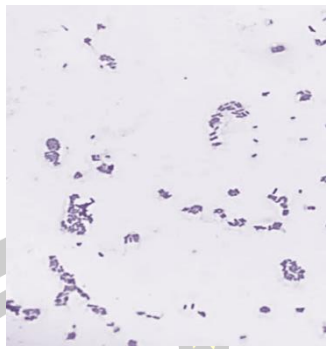
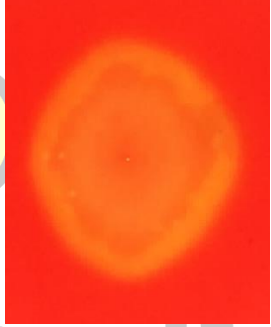
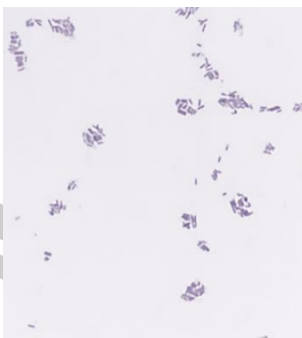
ตารางที่ 8 ลักษณะสีพื้นฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลสจำนวน 7 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในป่านาสีนวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัด
มหาสารคาม

ลำดับ	ไอโซเลท	Halo : colony ratio	Colony morphology	Gram staining
1	1.1CL1	 <p>2.00</p>	Irregular Flat Curled สี : ขาวขุ่น	 <p>Rod, G+</p>
2	1.1CL2	 <p>2.00</p>	Irregular Flat Curled สี : ขาวขุ่น	 <p>Rod, G+</p>



ตารางที่ 7 ลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผลิตขึ้นในชมเชลลูลีสจำนวน 7 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในป่าสนจำนวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม (ต่อ)

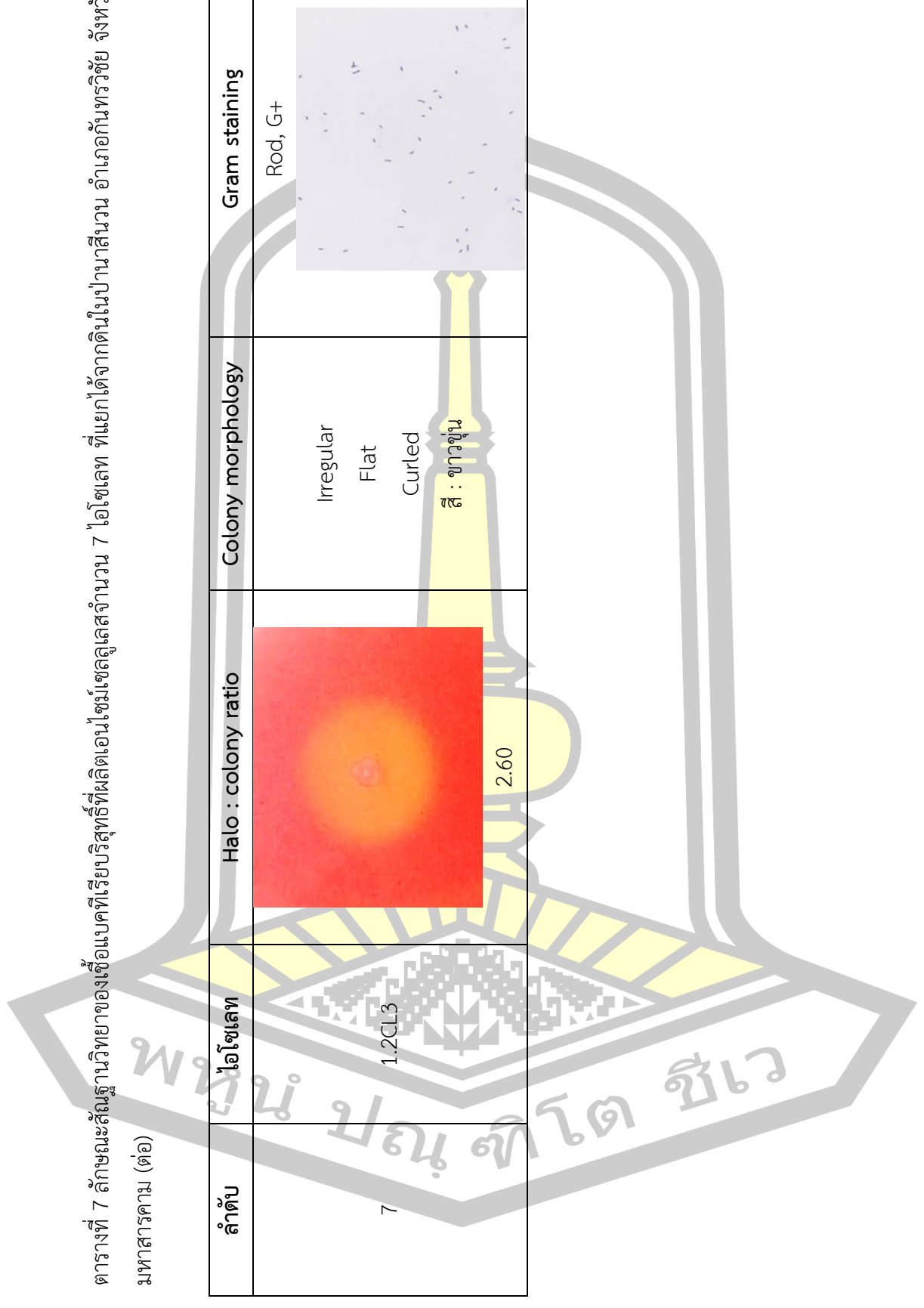
ลำดับ	ไอโซเลท	Halo : colony ratio	Colony morphology	Gram staining
3	1.1CL3	 <p>2.60</p>	Irregular Flat Curled สี : ขาวขุ่น	Rod, G+ 
4	1.1CL4	 <p>2.20</p>	Irregular Flat Curled สี : ขาวขุ่น	Rod, G+ 

ตารางที่ 7 ลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลสจำนวน 7 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในป่าสนจำนวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม (ต่อ)

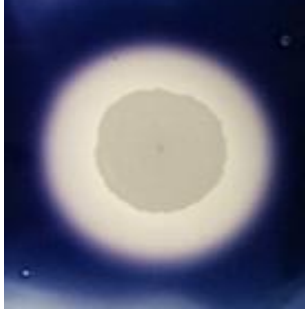
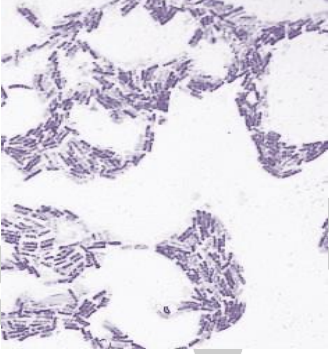
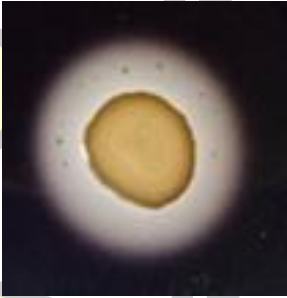

ลำดับ	ไอโซเลท	Halo : colony ratio	Colony morphology	Gram staining
5	1.1CL5	 <p>1.50</p>	Irregular Flat Curled สี : ขาวขุ่น	Rod, G+ 
6	1.2CL2	 <p>1.20</p>	Irregular Flat Curled สี : ขาวขุ่น	Rod, G+ 

ตารางที่ 7 ลักษณะพื้นฐานทางวิทยาของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลสจำนวน 7 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในป่าสนจำนวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัด
 มหาสารคาม (ต่อ)

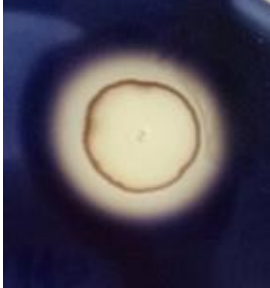
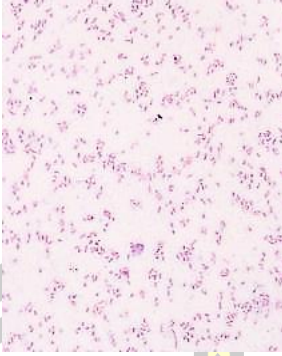
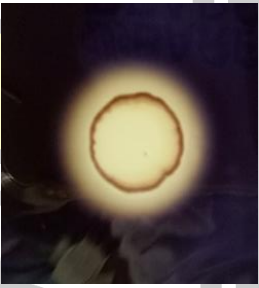
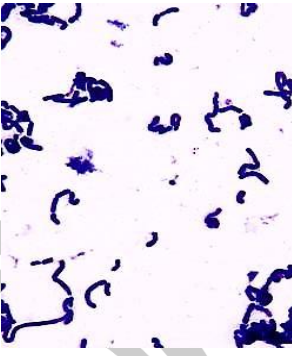
ลำดับ	ไอโซเลท	Halo : colony ratio	Colony morphology	Gram staining
7	1.2CL3	 2.60	Irregular Flat Curled สี : ขาวขุ่น	 Rod, G+



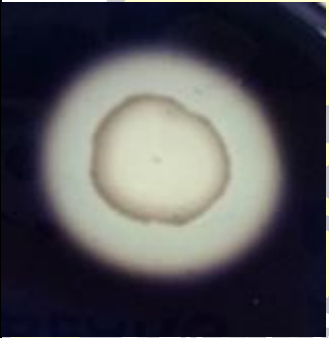
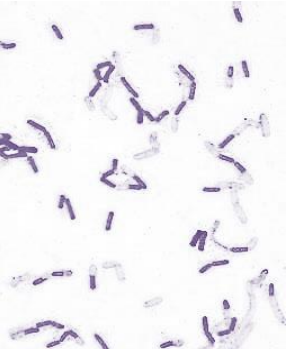

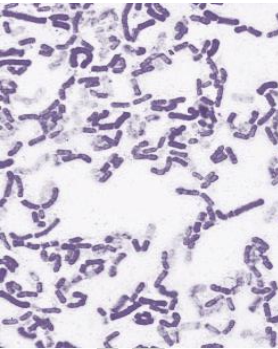
ตารางที่ 9 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสจำนวน 32 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในพื้นที่ป่านาสีนวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัด
มหาสารคาม

ลำดับ	ไอโซเลท	Halo : colony ratio	Colony morphology	Gram staining
1	1.1AL1	 1.66	Circular Effuse Smooth Erose Opaque	Bacilli , G+ 
2	1.1AL2	 1.88	Filamentous Effuse Rougose Filamentous Translucent	Bacilli , G+ 

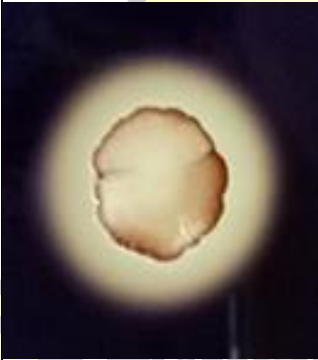
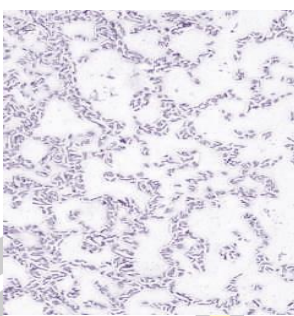

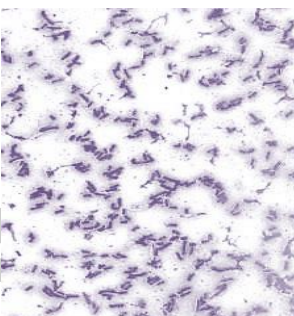
ตารางที่ 8 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสจำนวน 32 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในป่านาสีนวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัด
มหาสารคาม (ต่อ)

ลำดับ	ไอโซเลท	Halo : colony ratio	Colony morphology	Gram staining
3	1.2AL3	 1.58	Irregular Effuse Rougose Erose Dull	Rod , G+ 
4	1.3AL1	 1.43	Irregular Pulvinate Rougose Erose Dull	Bacilli , G+ 



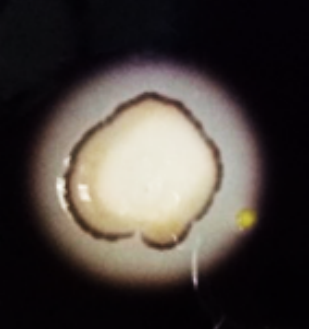
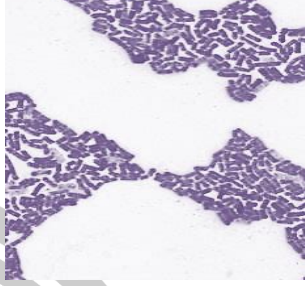
ตารางที่ 8 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผลิตเอ็นไซม์อะไมเลสจำนวน 32 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในป่านาสีนวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม (ต่อ)

ลำดับ	ไอโซเลท	Halo : colony ratio	Colony morphology	Gram staining
5	1.3AL2	 1.67	Irregula Convex Rough Entire Translucent	Bacilli , G+ 
6	1.4AL1	 1.50	Filamentous Convex Smooth Entire Opaque	Bacilli , G+ 

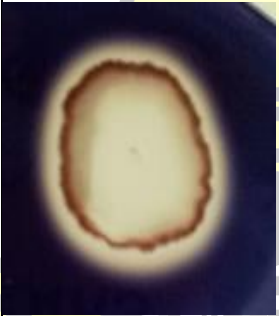
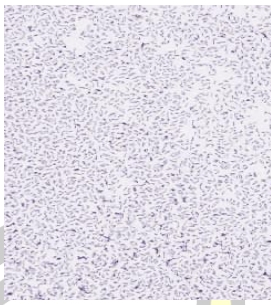
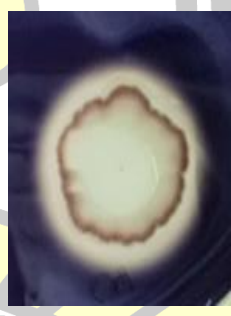

ตารางที่ 8 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผลิตเอ็นไซม์อะไมเลสจำนวน 32 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในป่าบนสีนวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัด
มหาสารคาม (ต่อ)

ลำดับ	ไอโซเลท	Halo : colony ratio	Colony morphology	Gram staining
7	1.4AL2	 1.60	Filamentous Effuse Contoured Entire Dull	 Rod , G+
8	1.4AL3	 1.36	Filamentous Effuse Contoured Entire Dull	 Rod , G+

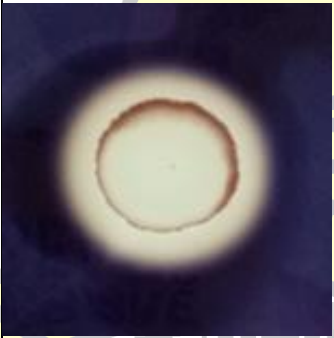
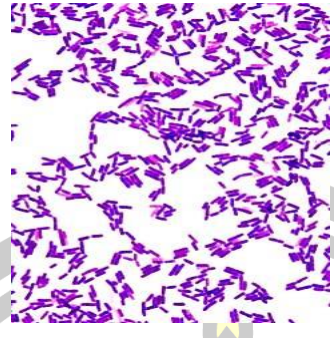
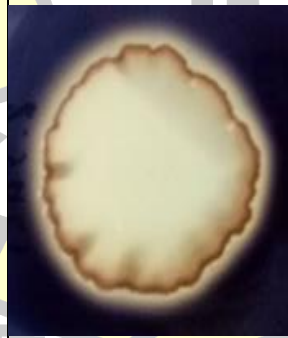
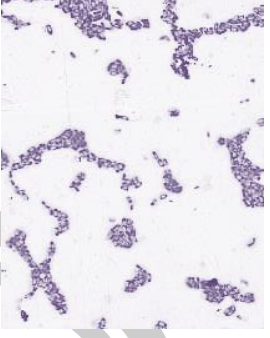
ตารางที่ 8 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผลิตเอ็นไซม์อะไมเลสจำนวน 32 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในป่าบนสีนวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม (ต่อ)

ลำดับ	ไอโซเลท	Halo : colony ratio	Colony morphology	Gram staining
9	1.4AL15	 1.10	Irregular Effuse Smooth Undulate Translucent	Bacilli , G+ 
10	2.1AL1	 1.40	Irregular Effuse Smooth Undulate Translucent	Bacilli , G+ 

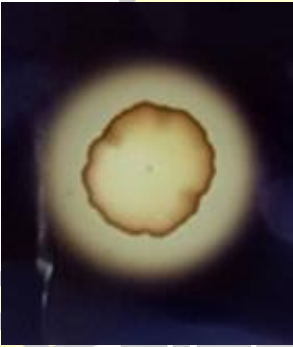

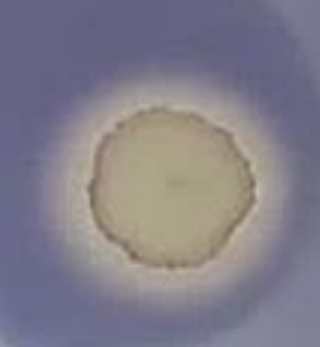

ตารางที่ 8 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผลิตเอ็นไซม์อะไมเลสจำนวน 32 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในป่าบนสีนวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัด
มหาสารคาม (ต่อ)

ลำดับ	ไอโซเลท	Halo : colony ratio	Colony morphology	Gram staining
11	2.1AL7	 1.15	Irregular Effuse Smooth Undulate Translucent	Rod , G+ 
12	2.2AL1	 1.20	Circular Convex Smooth Entire Opaque	Bacilli , G+ 


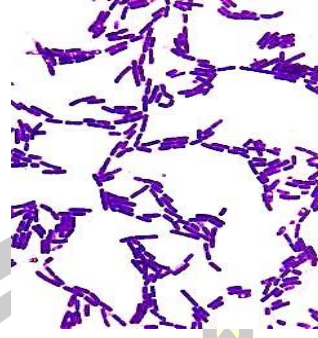
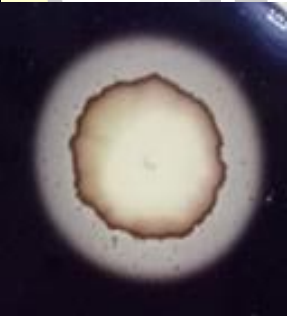

ตารางที่ 8 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสจำนวน 32 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในป่าบนาสีนวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัด
มหาสารคาม (ต่อ)

ลำดับ	ไอโซเลท	Halo : colony ratio	Colony morphology	Gram staining
13	2.2AL2	 1.44	Irregular Effuse Smooth Undulate Translucent	Bacilli , G+ 
14	2.3AL1	 1.20	Irregular Convex Rough Entire Translucent	Rod , G+ 




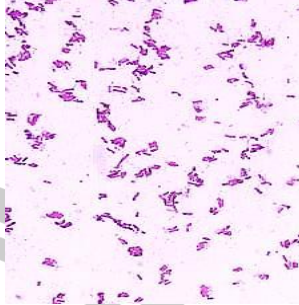
ตารางที่ 8 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสจำนวน 32 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในป่าสนจำนวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม (ต่อ)

ลำดับ	ไอโซเลท	Halo : colony ratio	Colony morphology	Gram staining
15	2.3AL2	 <p>1.55</p>	Irregular Effuse Smooth Undulate Translucent	Bacilli , G+ 
16	2.3AL7	 <p>1.50</p>	Irregular Pulvinate Rougose Erose Dull	Bacilli , G+ 

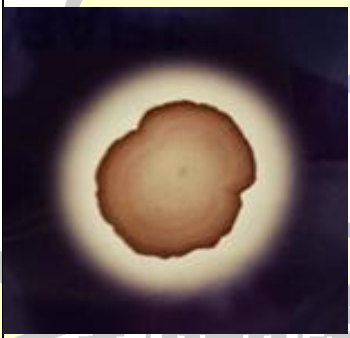
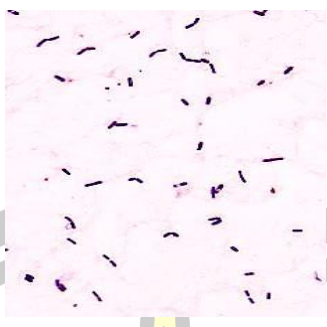


ตารางที่ 8 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผลิตเอ็นไซม์อะไมเลสจำนวน 32 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในป่านาสีนวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม (ต่อ)

ลำดับ	ไอโซเลท	Halo : colony ratio	Colony morphology	Gram staining
17	2.3AL8	 <p>1.62</p>	Irregular Pulvinate Rougose Erose Dull	 <p>Bacilli , G+</p>
18	2.3AL9	 <p>1.45</p>	Irregular Pulvinate Rougose Erose Dull	 <p>Bacilli , G+</p>

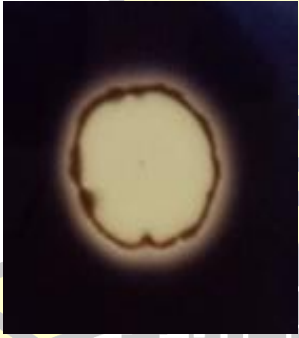

ตารางที่ 8 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผลิตเอ็นไซม์อะไมเลสจำนวน 32 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในป่านาสีนวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัด
มหาสารคาม (ต่อ)

ลำดับ	ไอโซเลท	Halo : colony ratio	Colony morphology	Gram staining
19	2.3AL10	 <p>1.20</p>	Irregular Pulvinate Rougose Erose Dull	Rod , G+ 
20	2.4AL1	 <p>1.25</p>	Irregular Effuse Smooth Undulate Translucent	Rod , G+ 

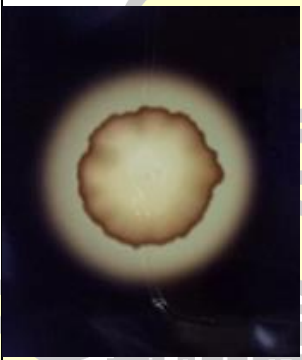
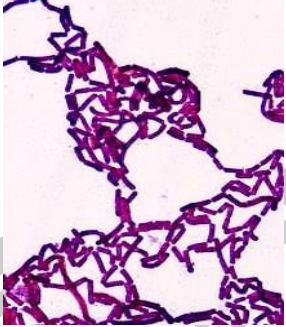

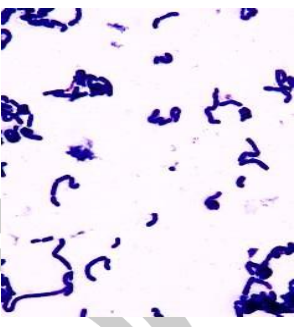
ตารางที่ 8 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผลิตเอ็นไซม์อะไมเลสจำนวน 32 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในป่าบนสีนวน อำเภอแก่งกระจาน จังหวัด
 มหาสารคาม (ต่อ)

ลำดับ	ไอโซเลท	Halo : colony ratio	Colony morphology	Gram staining
21	2.4AL2	 <p>1.50</p>	Irregular Pulvinate Rougose Erose Dull	 <p>Rod , G+</p>
22	3.1AL1	 <p>1.90</p>	Irregular Flat Rough Lobate Translucent	 <p>Rod , G+</p>

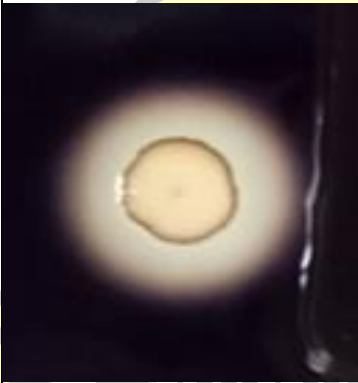
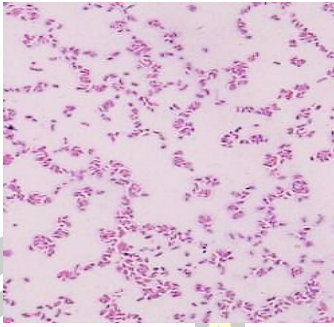


ตารางที่ 8 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผลิตเอ็นไซม์อะไมเลสจำนวน 32 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในป่าบนาสีนวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม (ต่อ)

ลำดับ	ไอโซเลท	Halo : colony ratio	Colony morphology	Gram staining
23	3.2AL1	 1.20	Irregular Effuse Smooth Undulate Translucent	Cocci , G+
24	3.3AL1	 1.75	Irregular Pulvinate Rougose Erose Dull	Rod , G+




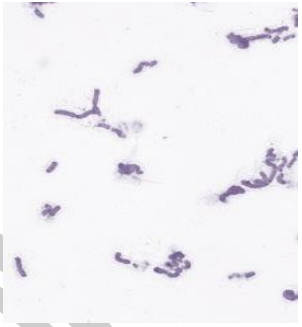
ตารางที่ 8 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผลิตเอ็นไซม์อะไมเลสจำนวน 32 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในป่านาสีนวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัด
มหาสารคาม (ต่อ)

ลำดับ	ไอโซเลท	Halo : colony ratio	Colony morphology	Gram staining
25	3.4AL1	 1.40	Irregular Flat Smooth Erose Opaque	Bacilli , G+ 
26	3.4AL2	 1.43	Irregular Flat Smooth Erose Opaque	Bacilli , G+ 

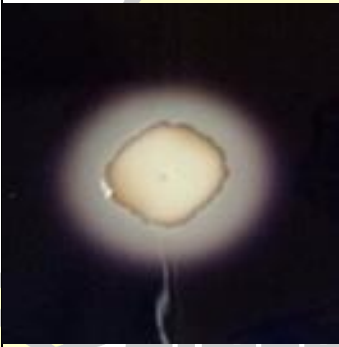
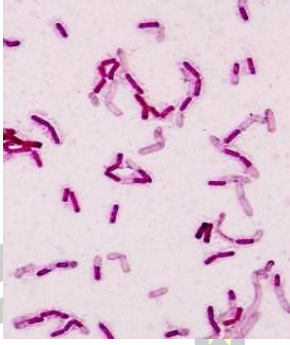
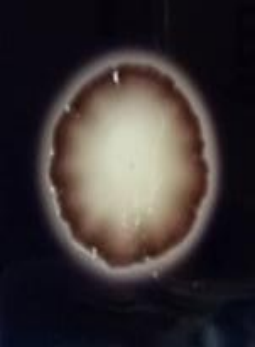

ตารางที่ 8 ลักษณะสีฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผลิตเอ็นไซม์อะไมเลสจำนวน 32 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในป่านาสีนวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม (ต่อ)

ลำดับ	ไอโซเลท	Halo : colony ratio	Colony morphology	Gram staining
27	3.4AL3	 <p>1.86</p>	Irregular Flat Rough Lobate Translucent	 <p>Rod , G+</p>
28	3.4AL4	 <p>2.50</p>	Irregular Flat Smooth Erode Opaque	 <p>Rod , G+</p>

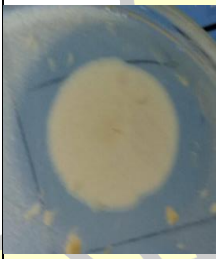
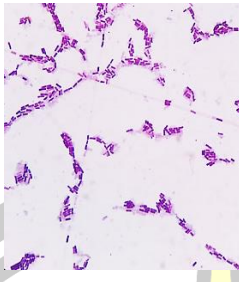
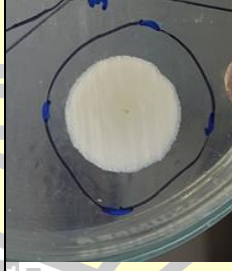

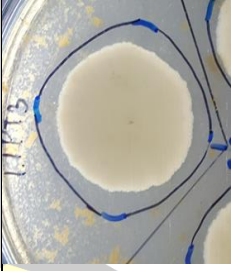
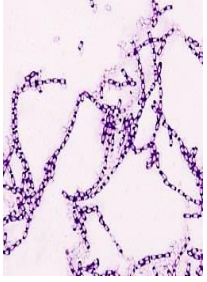
ตารางที่ 8 ลักษณะสีพื้นฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียประเภทที่เรียบริสซูรีที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสจำนวน 32 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในป่านาสีนวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม (ต่อ)

ลำดับ	ไอโซเลท	Halo : colony ratio	Colony morphology	Gram staining
29	3.5AL1	 <p>1.44</p>	Irregular Convex Smooth Undulate Opaque	Rod , G+ 
30	3.5AL2	 <p>1.50</p>	Irregular Flat Rough Lobate Translucent	Bacilli , G+ 


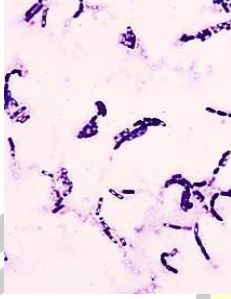



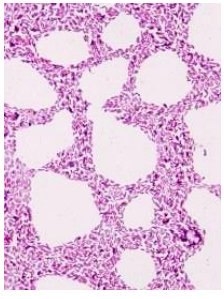
ตารางที่ 8 ลักษณะสีพื้นฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผลิตเอ็นไซม์อะไมเลสจำนวน 32 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในป่านาสีนวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม (ต่อ)

ลำดับ	ไอโซเลท	Halo : colony ratio	Colony morphology	Gram staining
31	3.5AL3	 1.43	Irregular Pulvinate Rougose Erose Dull	Rod , G+ 
32	3.6AL1	 1.15	Irregular Flat Smooth Erose Opaque	Rod , G+ 


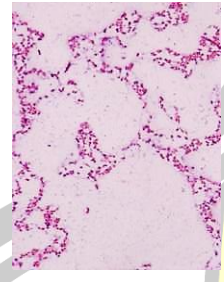
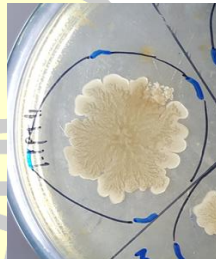
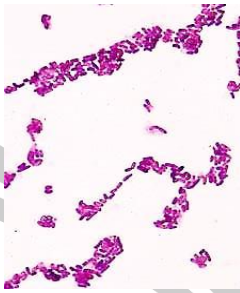

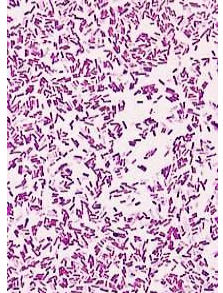
ตารางที่ 10 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโทค็อกคัสที่ผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสจำนวน 41 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในป่านาสีนวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัด
มหาสารคาม

ลำดับ	ไอโซเลท	Halo : colony ratio	Colony morphology	Gram staining
1	1.1PT1	 1.50	Circular Effuse Smooth Erose Dull	Bacilli , G+ 
2	1.1PT2	 1.54	Irregular Effuse Rough Erose Dull	Rod , G+ 
3	1.1PT3	 1.23	Irregular Effuse Rough Erose Dull	Bacilli , G+ 

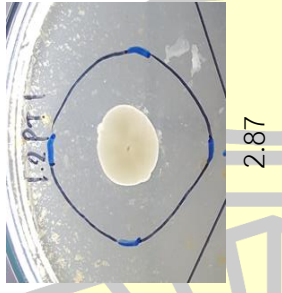
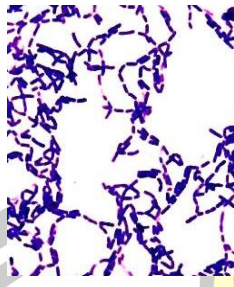
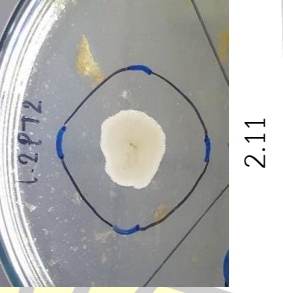
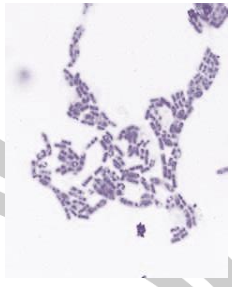
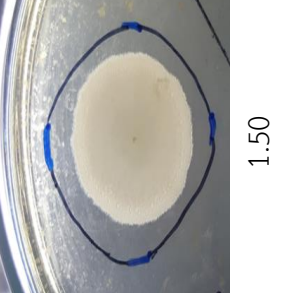
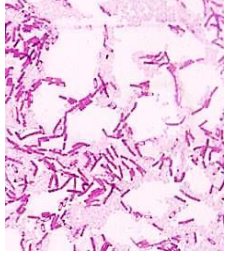
ตารางที่ 9 ลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสจำนวน 41 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในป่าสนสินวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัด
มหาสารคาม

ลำดับ	ไอโซเลท	Halo : colony ratio	Colony morphology	Gram staining
4	1.1PT7	 1.62	Circular Effuse Smooth Erose Dull	Bacilli , G+ 
5	1.1PT8	 1.57	Circular Effuse Smooth Erose Dull	Rod , G+ 
6	1.1PT9	 1.41	Circular Effuse Rough Entire Dull	Rod , G+ 

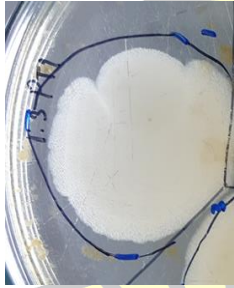
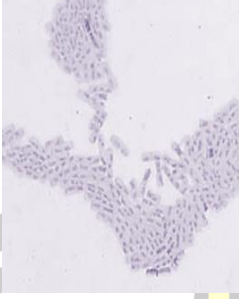
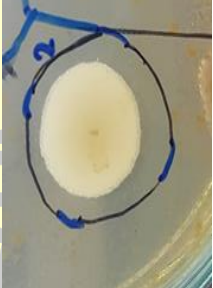
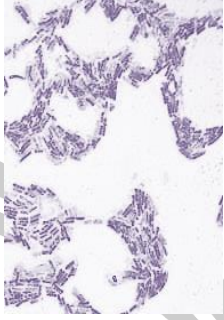
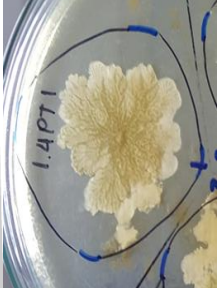
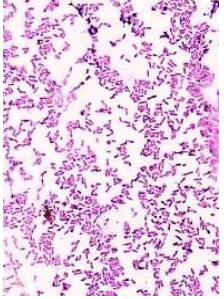
ตารางที่ 9 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผลิตเอนไซม์โปรตีนไฮโดรไลติกในปฏิกิริยาหมัก จำนวน 41 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในป่าสนจำนวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัด
มหาสารคาม

ลำดับ	ไอโซเลท	Halo : colony ratio	Colony morphology	Gram staining
7	1.1PT10	 1.74	Circular Effuse Smooth Erose Dull	 Rod , G+
8	1.1PT11	 1.53	Circular Effuse Rough Entire Dull	 Rod , G+
9	1.1PT12	 1.24	Circular Effuse Rough Entire Dull	 Rod , G+

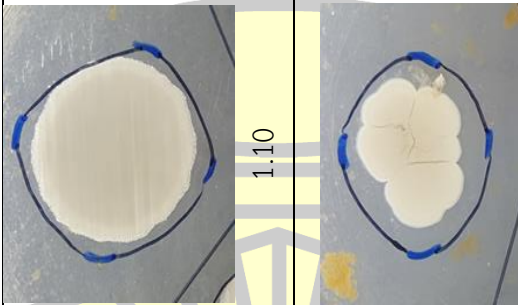
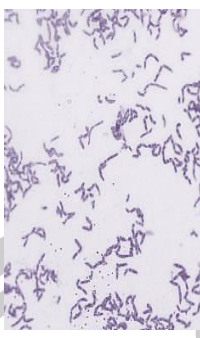
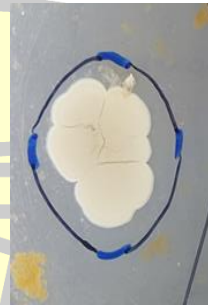



ตารางที่ 9 ลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสจำนวน 41 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในป่าบนสีนวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัด
มหาสารคาม

ลำดับ	ไอโซเลท	Halo : colony ratio	Colony morphology	Gram staining
10	1.2 PT1	 2.87	Circular Convex Smooth Entire Opaque	Bacilli , G+ 
11	1.2 PT2	 2.11	Irregular Pulvinate Rough Entire Translucent	Bacilli , G+ 
12	1.2 PT3	 1.50	Irregular Raised Smooth Erose Opaque	Bacilli , G+ 


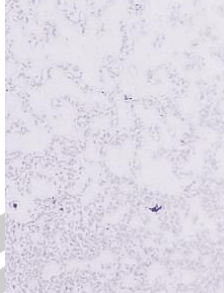

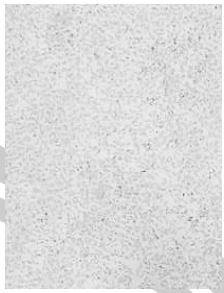


ตารางที่ 9 ลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสจำนวน 41 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในป่าบนสีนวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัด
มหาสารคาม

ลำดับ	ไอโซเลท	Halo : colony ratio	Colony morphology	Gram staining
13	1.3 PT1	 1.10	Irregular Convex Rough Undulate Translucent	Rod , G+ 
14	1.3PT2	 1.47	Circular Convex Smooth Entire Opaque	Rod , G+ 
15	1.4 PT1	 1.14	Circular Raised Rough Undulate Translucent	Rod , G+ 

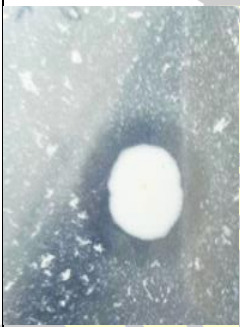

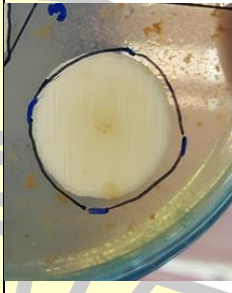
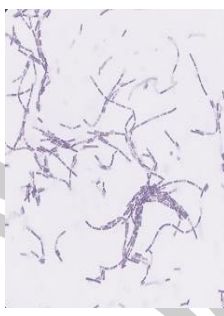

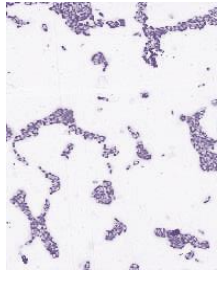
ตารางที่ 9 ลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผลิตเอนไซม์โปรตีนไฮโดรไลติกในปริมาณสูง จำนวน 41 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในป่าบนสิมวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัด
มหาสารคาม

ลำดับ	ไอโซเลท	Halo : colony ratio	Colony morphology	Gram staining
16	1.4 PT2	 <p>1.10</p>	Circular Raised Rough Undulate Translucent	Bacilli , G+ 
17	1.4 PT4	 <p>1.39</p>	Circular Convex Smooth Entire Opaque	Rod , G+ 
18	1.4 PT6	 <p>1.32</p>	Irregula Effuse Smooth Undulate Translucent	Rod , G+ 


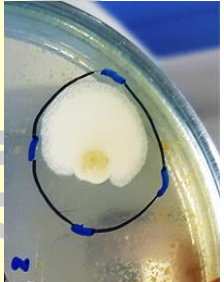

ตารางที่ 9 ลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผลิตเอนไซม์โปรตีนไฮโดรไลติกในปฏิกิริยาหมัก จำนวน 41 ไอโซเลต ที่แยกได้จากดินในป่าบนสิมวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัด
มหาสารคาม

ลำดับ	ไอโซเลต	Halo : colony ratio	Colony morphology	Gram staining
19	1.4PT7	 <p>1.25</p>	Circular Convex Smooth Entire Opaque	Rod , G+ 
20	1.4PT8	 <p>1.60</p>	Circular Convex Smooth Entire Opaque	Rod , G+ 
21	1.4PT9	 <p>1.70</p>	Circular Convex Smooth Entire Opaque	Rod , G+ 






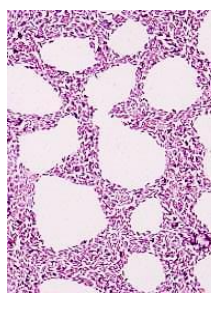
ตารางที่ 9 ลักษณะพื้นฐานของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผลิตเอนไซม์โปรตีนไฮโดรไลติกในปริมาณสูง จำนวน 41 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในป่าสนจำนวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัด
มหาสารคาม

ลำดับ	ไอโซเลท	Halo : colony ratio	Colony morphology	Gram staining
22	2.1PT1	 1.30	Irregula Effuse Rougose Filamentous Dull	 Rod , G+
23	2.1PT2	 1.10	Circular Effuse Smooth Entire Translucent	 Rod , G+
24	2.1PT3	 1.90	Circular Pulvinate Smooth Entire Translucent	 Rod , G+




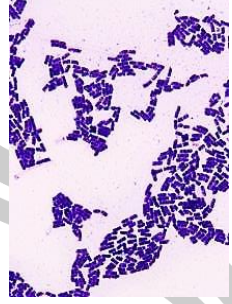

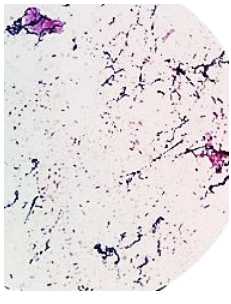
ตารางที่ 9 ลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสจำนวน 41 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในป่าบนสิมวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัด
มหาสารคาม

ลำดับ	ไอโซเลท	Halo : colony ratio	Colony morphology	Gram staining
25	2.2PT1	 2.0	Circular Effuse Smooth Entire Translucent	Bacilli , G+
26	2.2PT2	 1.42	Circular Convex Smooth Lobate Dull	Bacilli , G+
27	2.2PT3	 2.40	Irregula Raised Smooth Entire Opaque	Bacilli , G+

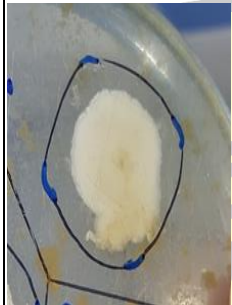
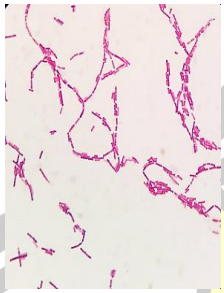
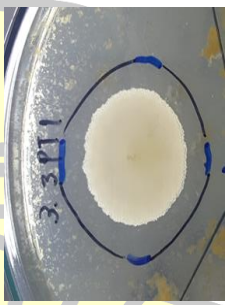
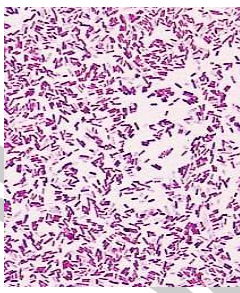

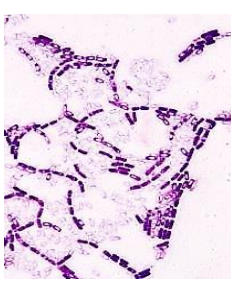
ตารางที่ 9 ลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผลิตเอนไซม์โปรตีนไฮโดรไลติกในปริมาณสูง จำนวน 41 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในป่าบนสิมวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัด
มหาสารคาม

ลำดับ	ไอโซเลท	Halo : colony ratio	Colony morphology	Gram staining
28	2.3PT3	 2.50	Circular Convex Smooth Undulate Opaque	Bacilli , G+ 
29	2.3PT5	 1.20	Irregula Flat Rough Lobate Opaque	Rod , G+ 
30	2.4PT1	 2.80	Irregula Flat Smooth Lobate Opaque	Rod , G+ 

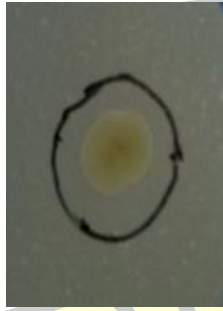
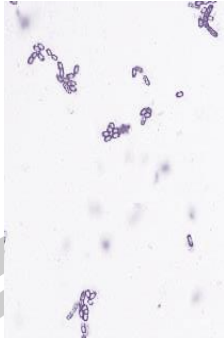

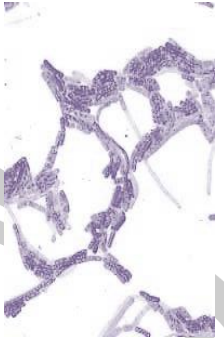

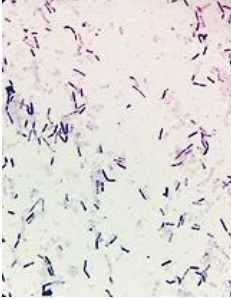
ตารางที่ 9 ลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผลิตเอนไซม์โปรตีนไฮโดรไลติกในปริมาณสูง จำนวน 41 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในป่าบนสิมวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัด
มหาสารคาม

ลำดับ	ไอโซเลท	Halo : colony ratio	Colony morphology	Gram staining
31	2.4PT2	 1.43	Irregula Flat Smooth Lobate Dull	Rod , G+ 
32	3.1PT1	 1.30	Irregula Flat Rough Lobate Opaque	Bacilli , G+ 
33	3.1PT3	 1.50	Circular Effuse Rough Entire Dull	Bacilli , G+ 


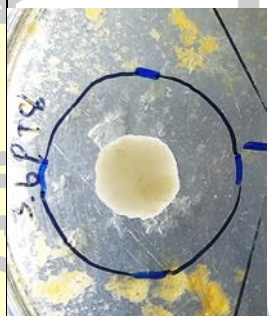
ตารางที่ 9 ลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสจำนวน 41 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในป่าสนสินวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัด
มหาสารคาม

ลำดับ	ไอโซเลท	Halo : colony ratio	Colony morphology	Gram staining
34	3.2PT1	 1.30	Irregula Flat Rough Lobate Opaque	Rod , G+ 
35	3.3PT1	 1.70	Circular Effuse Smooth Entire Translucent	Rod , G+ 
36	3.5PT2	 1.10	Irregula Flat Rough Lobate Opaque	Bacilli , G+ 


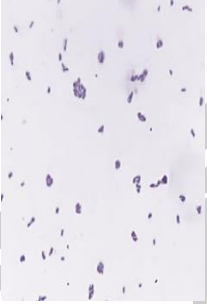


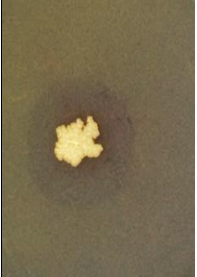

ตารางที่ 9 ลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผลิตเอนไซม์โปรตีนไฮโดรไลติกในปริมาณสูง จำนวน 41 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในป่าบนสีนวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัด
มหาสารคาม

ลำดับ	ไอโซเลท	Halo : colony ratio	Colony morphology	Gram staining
37	3.5PT7	 <p>2.00</p>	Irregula Flat Rough Lobate Opaque	Bacilli , G+ 
38	3.5PT10	 <p>1.15</p>	Irregula Flat Rough Lobate Opaque	Bacilli , G+ 
39	3.6PT2	 <p>1.71</p>	Irregula Flat Smooth Lobate Dull	Rod , G+ 

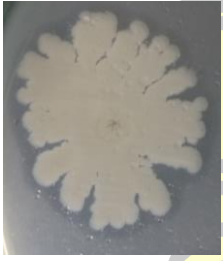
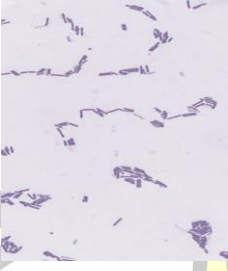


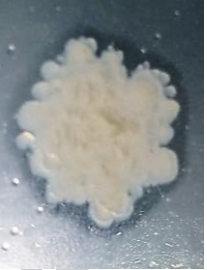
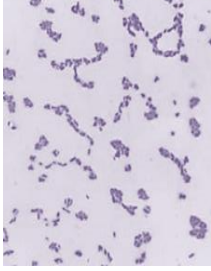
ตารางที่ 9 ลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสจำนวน 41 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในป่าสนจำนวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัด
มหาสารคาม

ลำดับ	ไอโซเลท	Halo : colony ratio	Colony morphology	Gram staining
40	3.6 PT7		Circular Convex Smooth Undulate Opaque	Rod , G+
41	3.6 PT8		Circular Convex Smooth Undulate Opaque	Rod , G+







ตารางที่ 11 ลักษณะสีพื้นฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผลิตเอ็นไซม์ไลเปสจำนวน 35 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในป่านาสีนวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัด
มหาสารคาม

ลำดับ	ไอโซเลท	Halo : colony ratio	Colony morphology	Gram staining
1	1.1LP1	 1.60	Irregular Flat Curled สี : ขาวขุ่น	Rod, G+ 
2	1.1LP2	 1.14	Irregular Flat Curled สี : ขาวขุ่น	Rod, G+ 
3	1.1LP3	 2.25	Irregular Flat Curled สี : ขาวขุ่น	Bacilli, G+ 

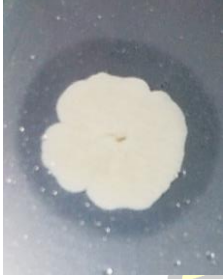





ตารางที่ 10 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจำนวน 35 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในป่าสนจำนวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัด
มหาสารคาม

ลำดับ	ไอโซเลท	Halo : colony ratio	Colony morphology	Gram staining
4	1.1LP4	 1.10	Irregular Umbonate Lobate สี : ขาวขุ่น	Rod, G+ 
5	1.1LP5	 1.30	Irregular Umbonate Lobate สี : ขาวขุ่น	Rod, G+ 
6	1.2LP1	 1.10	Circular Flat Undulate สี : ครีมหุ่น	Cocci, G+ 


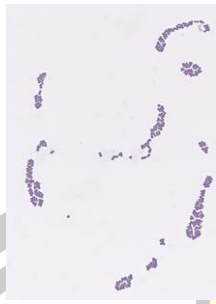

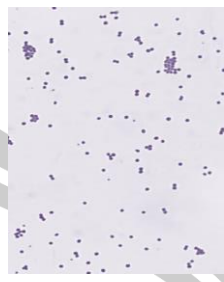
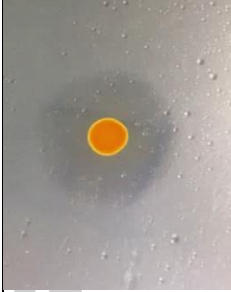

ตารางที่ 10 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผลิตเอ็นไซม์ไลเปสจำนวน 35 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในป่าสนปริมาณ อำเภอกันทรวิชัย จังหวัด
มหาสารคาม

ลำดับ	ไอโซเลท	Halo : colony ratio	Colony morphology	Gram staining
7	1.2LP2	 2.00	Irregular Flat Lobate สี : ครีมขุ่น	Rod, G+ 
8	1.2LP3	 1.10	Irregular Flat Curled สี : ครีมขุ่น	Rod, G+ 
9	1.2LP4	 2.33	Irregular Convex Erose สี : ครีมขุ่น	Rod, G+ 


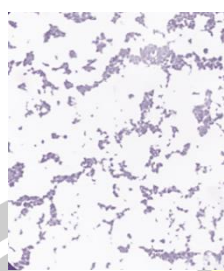

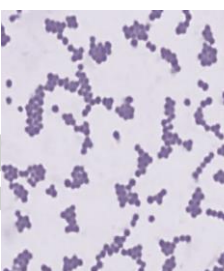

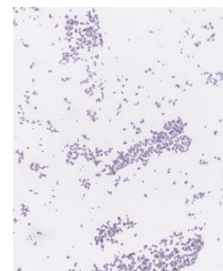
ตารางที่ 10 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจำนวน 35 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในป่าสนจำนวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัด
 มหาสารคาม

ลำดับ	ไอโซเลท	Halo : colony ratio	Colony morphology	Gram staining
10	1.3LP1	 <p>1.50</p>	Irregular Convex Erode สี : ครีมขุ่น	Rod, G+ 
11	1.3LP2	 <p>2.60</p>	Irregular Flat Curled สี : ขาวขุ่น	Rod, G+ 
12	1.3LP6	 <p>1.25</p>	Irregular Flat Lobate สี : ขาวขุ่น	Bacilli, G+ 


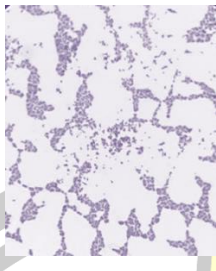


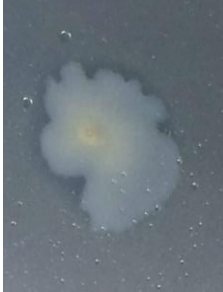

ตารางที่ 10 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจำนวน 35 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในป่าสนจำนวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม

ลำดับ	ไอโซเลท	Halo : colony ratio	Colony morphology	Gram staining
13	1.3LP7	 <p>2.00</p>	Circular Flat Undulate สี : สีเหลืองแฉะวาว	Cocci, G+ 
14	1.3LP9	 <p>2.67</p>	Punctiform Flat Entire สี : ส้มแฉะวาว	Cocci, G+ 
15	1.4LP3	 <p>3.00</p>	Punctiform Flat Entire สี : ขาวอมเหลืองแฉะวาว	Cocci, G+ 

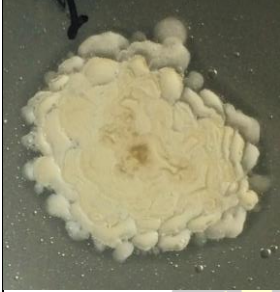
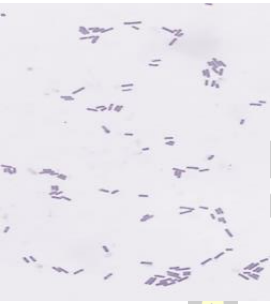

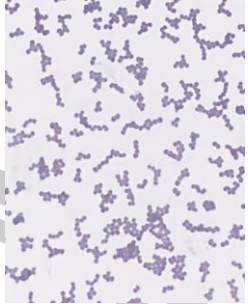
ตารางที่ 10 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจำนวน 35 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในป่านาสีนวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัด
มหาสารคาม

ลำดับ	ไอโซเลท	Halo : colony ratio	Colony morphology	Gram staining
16	1.4LP4	 <p>2.50</p>	<p>Circular Flat Undulate</p> <p>สี : ขาวและขาว</p>	<p>Cocci, G+</p> 
17	1.4LP6	 <p>1.40</p>	<p>Irregular Flat Curled</p> <p>สี : ขาวอมเหลืองและขุ่น</p>	<p>Cocci, G+</p> 
18	1.4LP7	 <p>2.30</p>	<p>Punctiform Flat Entire</p> <p>สี : เหลืองขาว</p>	<p>Cocci, G+</p> 


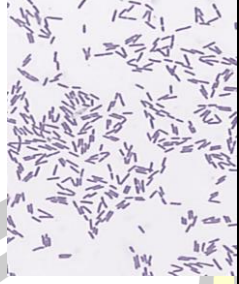




ตารางที่ 10 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจำนวน 35 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในป่าสนนวม อำเภอกันทรวิชัย จังหวัด
มหาสารคาม

ลำดับ	ไอโซเลท	Halo : colony ratio	Colony morphology	Gram staining
19	1.4LP8	 2.00	Punctiform ความหนา : Flat ลักษณะขอบ : Entire สี : เหลืองขาว	 Cocci, G+
20	1.4LP11	 1.20	Irregular Flat Undulate สี : ขาวและขาว	 Rod, G+
21	1.4LP12	 1.20	Irregular Flat Undulate สี : ขาวและขาว	 Rod, G+


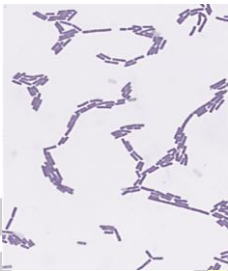

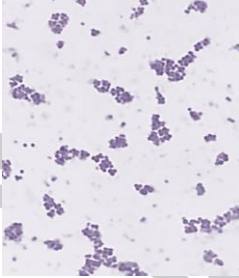


ตารางที่ 10 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจำนวน 35 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในป่าสนนวม อำเภอกันทรวิชัย จังหวัด
 มหาสารคาม

ลำดับ	ไอโซเลท	Halo : colony ratio	Colony morphology	Gram staining
22	2.1LP1	 <p>1.10</p>	Irregular Flat Curled สี : ครึ่งชมพู	Rod, G+ 
23	2.1LP3	 <p>1.67</p>	Punctiform Flat Entire สี : ขาวและขาว	Cocci, G+ 




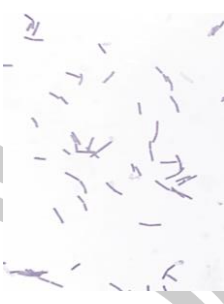
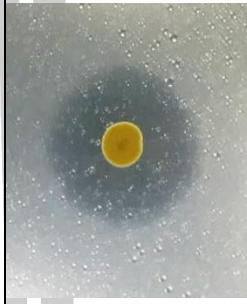
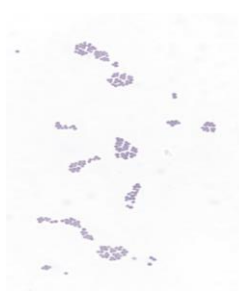
ตารางที่ 10 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจำนวน 35 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในป่าสนนวม อำเภอกันทรวิชัย จังหวัด
มหาสารคาม

ลำดับ	ไอโซเลท	Halo : colony ratio	Colony morphology	Gram staining
24	2.1LP4	 3.33	Punctiform Flat Entire สี : ขาวและวาว	 Rod, G+
25	2.1LP5	 1.30	Iregular Flat Lobate สี : ขาวอมเหลืองและวาว	 Rod, G+
26	2.4LP1	 2.14	Iregular Flat Lobate สี : ขาวและขุ่น	 Rod, G+






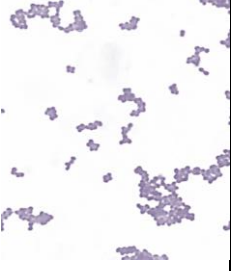
ตารางที่ 10 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจำนวน 35 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในป่าสนจำนวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัด
มหาสารคาม

ลำดับ	ไอโซเลท	Halo : colony ratio	Colony morphology	Gram staining
27	3.2LP2	 2.60	Filamentous Flat Filamentous สี : ขาว	Bacilli, G+ 
28	3.2LP3	 2.00	Circular Convex Undulate สี : เหลืองแฉะขาว	Cocci, G+ 
29	3.2LP5	 1.66	Circular Convex Undulate สี : เหลืองแฉะขาว	Cocci, G+ 

ตารางที่ 10 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจำนวน 35 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในป่านาสีนวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัด
มหาสารคาม

ลำดับ	ไอโซเลท	Halo : colony ratio	Colony morphology	Gram staining
30	3.3LP1	 4.67	Punctiform Flat Entire สี : ขาวและขาว	Rod, G+ 
31	3.3LP4	 1.44	Irregular Flat Undulate สี : ขาวขุ่น	Bacilli, G+ 
32	3.3LP5	 3.33	Circular Convex Entire สี : เหลืองและขาว	Cocci, G+ 

ตารางที่ 10 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจำนวน 35 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในป่าสนนวม อำเภอกันทรวิชัย จังหวัด
มหาสารคาม

ลำดับ	ไอโซเลท	Halo : colony ratio	Colony morphology	Gram staining
33	3.3LP7	 <p>2.75</p>	Circular Convex Entire สี : เหลืองและขาว	Cocci, G+ 
34	3.3LP8	 <p>2.00</p>	Circular Flat Entire สี : ขาวและขาว	Cocci, G+ 
35	3.5LP2	 <p>2.25</p>	Circular Flat Entire สี : ขาวและขาว	Cocci, G+ 

4.3 การจำแนกสายพันธุ์แบบที่เรียกที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โปรตีนเอส และไลเปสทางอนุชีววิทยาโดยอาศัยเทคนิคยีน 16S rRNA sequencing

ผลการจำแนกสายพันธุ์แบบที่เรียกที่เรียกวิธีสุทธิตั้งที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส อะไมเลส โปรตีนเอส และไลเปส ในอาหารเหลว LB บ่มเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยเทคนิคยีน 16S rRNA sequencing พบว่า เชื้อแบคทีเรียที่จำแนกได้ส่วนใหญ่ใกล้เคียงกับแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. เปรียบเทียบกับเบียร์เช่นด้วยความเหมือน (% Identity) ในฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 12 การจำแนกสายพันธุ์แบบที่เรียกที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส อะไมเลส โปรตีนเอส และไลเปส ด้วยเทคนิค 16S rRNA sequencing

เอนไซม์	ไอโซเลข	Halo : Colony ratios (Mean \pm SD)	Closest relative ^a	Accession No. ^b	% Identity ^c	Origin ^d
เซลลูเลส	1.1CL1	1.99 \pm 0.01	<i>Bacillus licheniformis</i> CMF1Ph	KX424373.1	98	Fish gut, India
	1.1CL2	2.00 \pm 0.05	<i>Bacillus licheniformis</i> CMF1Ph	KX424373.1	98	Fish gut, India
	1.1CL3	2.60 \pm 0.01	<i>Bacillus licheniformis</i> TM13	KC857623.1	96	Saudi Arabia
	1.1CL4	2.20 \pm 0.02	<i>Bacillus subtilis</i> SA4	KY285264.1	94	Soil, Sudan

ตารางที่ 11 การจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส อะไมเลส โปรตีเอส และไลเปส ด้วยเทคนิค 16S rRNA sequencing (ต่อ)

เอนไซม์	ไอโซเลท	Halo : Colony ratios	Closest relative ^a	Accession No. ^b	% Identity ^c	Origin ^d
อะไมเลส	1.1CL5	1.50 ± 0.02	<i>Bacillus licheniformis</i> TM13	KC857623.1	96	Saudi Arabia
	1.2CL2	1.20 ± 0.02	<i>Bacillus subtilis</i> SA9	KY285265.1	99	Soil, Sudan
	1.2CL3	2.60 ± 0.04	<i>Bacillus licheniformis</i> MA-42	KX426642.1	97	Rhizospheric soil from desert, Bahawalpur
โปรตีเอส	1.1AL1	1.66 ± 0.03	<i>Bacillus pseudomycoloides</i> FJAT-hcl-17	KY653098.1	99	<i>Paris polyphylla</i> var. <i>chinensis</i> , China
	1.1AL2	1.88 ± 0.02	<i>Bacillus</i> sp. 188Cu-As	KM349197	99	Biofilms, Argentina
	1.2AL3	1.58 ± 0.03	<i>Bacillus anthracis</i> SAK4	MG706137.1	100	Soil, Republic of Korea
	1.3AL1	1.43 ± 0.02		N/A		
	1.3AL2	1.67 ± 0.02		N/A		
	1.4AL1	1.50 ± 0.03	<i>Bacillus</i> sp. CNJ732 PL04	DQ448749.1	99	Marine sediment, USA

ตารางที่ 11 การจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส อะไมเลส โปรตีเอส และไลเปส ด้วยเทคนิค 16S rRNA sequencing (ต่อ)

เอนไซม์	ไอโซเลท	Halo : Colony ratios	Closest relative ^a	Accession No. ^b	% Identity ^c	Origin ^d
	1.4AL2	1.60 ± 0.03		N/A		
	1.4AL3	1.36 ± 0.02	<i>Bacillus cereus</i> B19	MK229038.1	99	Wheat grain, Israel
	1.4AL15	1.10 ± 0.04	<i>Acinetobacter</i> sp. JLT159	KX989241	97	Shallow-sea hydrothermal system in Kueishantao Islet, China
	2.1AL1	1.40 ± 0.02	<i>Enterobacter</i> <i>cloacae</i>	LC040932.1	83	Groundnut, Pakistan
	2.1AL2	1.15 ± 0.02	<i>Enterobacter</i> <i>cloacae</i>	KX431213.1	98	Avian embryo, China
	2.2AL1	1.20 ± 0.02	HNXY160623 <i>Bacillus thuringiensis</i>	HF584771.1	99	Grapevine root system, Italy
	2.2AL2	1.44 ± 0.01	BD17-E12			
	2.3AL1	1.20 ± 0.02	<i>Bacillus thuringiensis</i> BD17-E12	HF584771.1	99	Grapevine root system, Italy
	2.3AL2	1.56 ± 0.03		N/A		

ตารางที่ 11 การจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส อะไมเลส โปรตีเอส และไลเปส ด้วยเทคนิค 16S rRNA sequencing (ต่อ)

เอนไซม์	ไอโซล	Halo : Colony ratios	Closest relative ^a	Accession No. ^b	% Identity ^c	Origin ^d
	2.3AL7	1.50 ± 0.03		N/A		
	2.3AL8	1.62 ± 0.03	<i>Bacillus cereus</i> DFT-1	KY750685	98	Seawater of industrial area, Indonesia
	2.3AL9	1.45 ± 0.04	<i>Bacillus</i> sp. PTP1	KY910137	96	Papaya Mealybug Gut, India
	2.3AL10	1.20 ± 0.04	<i>Bacillus cereus</i> YPC1	JQ308587	99	Geocarposphere soil of peanut growing area, China
	2.4AL1	1.25 ± 0.02	<i>Escherichia coli</i> C700-09	LT719075.1	93	Feces, Denmark
	2.4AL2	1.50 ± 0.02	<i>Bacillus pseudomycooides</i> 74	MH910178.1	99	India
	3.1AL1	1.90 ± 0.01		N/A		
	3.2AL1	1.20 ± 0.02	<i>Bacillus thuringiensis</i> IARI-HMWP-38	KF054891.1	99	Wheat rhizosphere, India
	3.3AL1	1.75 ± 0.02		N/A		

ตารางที่ 11 การจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส อะไมเลส โปรตีเอส และไลเปส ด้วยเทคนิค 16S rRNA sequencing (ต่อ)

เอนไซม์	ไอโซเลท	Halo : Colony ratios	Closest relative ^a	Accession No. ^b	% Identity ^c	Origin ^d
	3.4AL1	1.40 ± 0.02	<i>Bacillus cereus</i> F4a	MK088302.1	99	Tea Rhizosphere soil, India
	3.4AL2	1.43 ± 0.01		N/A		
	3.4AL3	1.86 ± 0.02		N/A		
	3.4AL4	2.50 ± 0.01	<i>Bacillus thuringiensis</i> BD17-E12	HF584771.1	99	Grapevine root system, Italy
	3.5AL1	1.44 ± 0.00		N/A		
	3.5AL2	1.43 ± 0.01		N/A		
	3.5AL3	1.50 ± 0.02	<i>Bacillus cereus</i> SP1-AB4	MH013307.1	99	Unidentified marine sponge 1, South Africa
โปรตีเอส	1.1PT1	1.50 ± 0.03		N/A		
	1.1PT2	1.54 ± 0.03	<i>Bacillus anthracis</i> ANA1	MG593550.1	99	Marine sediment, India
	1.1PT3	1.23 ± 0.03	<i>Bacillus cereus</i> IARI-ME-36	KJ752763.1	99	Acidic soil, India

ตารางที่ 11 การจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส อะไมเลส โปรตีเอส และไลเปส ด้วยเทคนิค 16S rRNA sequencing (ต่อ)

แอนิเมย์	ไอโซเลท	Halo : Colony ratios	Closest relative ^a	Accession No. ^b	% Identity ^c	Origin ^d
	1.1PT7	1.62 ± 0.02		N/A		
	1.1PT8	1.57 ± 0.04	<i>Bacillus subtilis</i> TP5	KX822704.1	99	Korea
	1.1PT9	1.41 ± 0.04	<i>Bacillus subtilis</i> BCB-19	MG832888.1	99	Herbal vermicompost, India
	1.1PT10	1.74 ± 0.00		N/A		
	1.1PT11	1.53 ± 0.03		N/A		
	1.1PT12	1.24 ± 0.01		N/A		
	1.2PT1	2.87 ± 0.01	<i>Bacillus thuringiensis</i> BD17-E12	HF584771.1	99	Grapevine root system, Italy
	1.2PT2	2.11 ± 0.03	<i>Bacillus cereus</i> F4a	MK088302.1	99	Tea Rhizosphere soil, India
	1.2PT3	1.50 ± 0.03	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>stercoris</i> HY5	MK332369.1	99	India
	1.3PT1	1.10 ± 0.03		N/A		

ตารางที่ 11 การจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส อะไมเลส โปรตีเอส และไลเปส ด้วยเทคนิค 16S rRNA sequencing (ต่อ)

เอนไซม์	ไอโซเลท	Halo : Colony ratios	Closest relative ^a	Accession No. ^b	% Identity ^c	Origin ^d
	1.3PT2	1.47 ± 0.00	<i>Bacillus cereus</i> KC1CW	KU521337	97	Farm soil, India
	1.4PT2	1.10 ± 0.01	<i>Bacillus toyonensis</i> DFT-2	KY750686.1	97	Seawater of industrial area, India
	1.4PT4	1.39 ± 0.00		N/A		
	1.4PT6	1.32 ± 0.02	<i>Bacillus cereus</i> DFT-4	KY750688.1	96	Seawater of industrial area, India
	1.4PT7	1.25 ± 0.01		N/A		
	1.4PT8	1.60 ± 0.02	<i>Bacillus cereus</i> K7	KF641825.1	99	rumen, China
	1.4PT9	1.70 ± 0.04	<i>Bacillus thuringiensis</i> BE4-2	FJ696643	100	Leather tanning wastewater, Switzerland
	2.1PT1	1.30 ± 0.01		N/A		
	2.1PT2	1.10 ± 0.02		N/A		

ตารางที่ 11 การจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส อะไมเลส โปรตีเอส และไลเปส ด้วยเทคนิค 16S rRNA sequencing (ต่อ)

เอนไซม์	ไอโซเลท	Halo : Colony ratios	Closest relative ^a	Accession No. ^b	% Identity ^c	Origin ^d
	2.1PT3	1.90 ± 0.04	<i>Bacillus cereus</i> F4a	MK088302.1	99	Tea Rhizosphere soil, India soil, India
	2.2PT1	1.81 ± 0.42	<i>Bacillus cereus</i> RE01-BS05	KJ742939	98	Fermented shrimp paste, belachan, Malaysia
	2.2PT2	1.42 ± 0.03	N/A	N/A		
	2.2PT3	2.40 ± 0.01	<i>Bacillus cereus</i> AKF 14	KX694390.1	99	Rocky soil, India
	2.3PT3	2.49 ± 0.02	<i>Bacillus subtilis</i> GF1_16SF_brmvyas_tejalp opat	MG976619	98	China
	2.3PT5	1.19 ± 0.01	<i>Escherichia coli</i> pO86A1	AB255435.1	88	Japan
	2.4PT1	2.80 ± 0.04	<i>Bacillus cereus</i> CP1	JX544748.1	98	China
	2.4PT2	1.43 ± 0.01	<i>Bacillus cereus</i> 2Y-2	FJ493043	99	Wheat, China
	3.1PT1	1.30 ± 0.05	N/A	N/A		

ตารางที่ 11 การจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส อะไมเลส โปรตีเอส และไลเปส ด้วยเทคนิค 16S rRNA sequencing (ต่อ)

เอนไซม์	ไอโซเลท	Halo : Colony ratios	Closest relative ^a	Accession No. ^b	% Identity ^c	Origin ^d
	3.1PT3	1.50 ± 0.05	<i>Bacillus thuringiensis</i> IARI-IWP-38	KF054891.1	99	Wheat rhizosphere, India
	3.2PT1	1.30 ± 0.03		N/A		
	3.3PT1	1.70 ± 0.02		N/A		
	3.5PT2	1.10 ± 0.04		N/A		
	3.5PT7	1.20 ± 0.03	<i>Staphylococcus lugdunensis</i> WMA-BD4	KT008386	99	Deserts, Pakistan
	3.5PT10	1.15 ± 0.02	<i>Enterobacter</i> sp. strain T311	KM406403	96	Irrigation water of salt affected, Pakistan
	3.6PT2	1.71 ± 0.03		N/A		
	3.6PT7	2.00 ± 0.18	<i>Enterobacter</i> sp. RD_MOSAA_04	KU597514	95	Soil, Spain
	3.6PT8	2.60 ± 0.01		N/A		

ตารางที่ 11 การจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส อะไมเลส โปรตีเอส และไลเปส ด้วยเทคนิค 16S rRNA sequencing (ต่อ)

เอนไซม์	ไอโซเลท	Halo : Colony ratios	Closest relative ^a	Accession No. ^b	% Identity ^c	Origin ^d
ไลเปส	1.1LP1	1.60 ± 0.01	<i>Bacillus licheniformis</i> KW55P	MH424451.1	99	Hot springs, Malaysia
	1.1LP2	1.14 ± 0.02	<i>Bacillus</i> sp. enrichment culture clone O2	FJ791170.1	99	Oil-contaminated topsoil, USA
	1.1LP3	2.25 ± 0.04	<i>Bacillus thuringiensis</i> BD17-E12	HF584771.1	99	Grapevine root system, Italy
	1.1LP4	1.10 ± 0.04	<i>Bacillus cereus</i> LA322	KY622401.1	99	Spacecraft and associated surfaces, USA
โปรตีเอส	1.1LP5	1.30 ± 0.04	<i>Bacillus licheniformis</i> NEE1	MH577800.1	99	Contaminated soil, China
	1.2LP1	1.10 ± 0.04	<i>Bacillus licheniformis</i> TG2	MG977020.1	99	India
	1.2LP2	2.00 ± 0.04		N/A		
	1.2LP3	1.10 ± 0.03		N/A		
1.2LP4	2.33 ± 0.03	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> CK5	EU982902.1	99	Rhizosphere, China	

ตารางที่ 11 การจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส อะไมเลส โปรตีเอส และไลเปส ด้วยเทคนิค 16S rRNA sequencing (ต่อ)

เอนไซม์	ไอโซเลท	Halo : Colony ratios	Closest relative ^a	Accession No. ^b	% Identity ^c	Origin ^d
	1.3LP1	1.50 ± 0.05	N/A	N/A		
	1.3LP2	2.60 ± 0.02	<i>Bacillus subtilis</i> APBSWPTB156	MG733629.1	99.8	Bioaerosols, India
	1.3LP6	1.25 ± 0.04	<i>Bacillus cereus</i> A1	MH648616.1	99	Water, Brazil
	1.3LP7	2.00 ± 0.08	<i>Staphylococcus cohnii</i> XH152	KF424739.1	98	Deep-sea sidiments, China
	1.3LP9	2.67 ± 0.04	<i>Staphylococcus</i> sp. CLC-F24	MH518206.1	98	China
	1.4LP3	3.00 ± 0.01	<i>Staphylococcus</i> sp. CLC-F2	MH518187.1	99	China
	1.4LP4	2.50 ± 0.02	<i>Staphylococcus</i> sp. CLC- F24	MH518206.1	99	China
	1.4LP6	1.40 ± 0.03	N/A	N/A		

ตารางที่ 11 การจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส อะไมเลส โปรตีเอส และไลเปส ด้วยเทคนิค 16S rRNA sequencing (ต่อ)

เอินไซม์	ไอโซเลท	Halo : Colony ratios	Closest relative ^a	Accession No. ^b	% Identity ^c	Origin ^d
	1.4LP7	2.30 ± 0.04	<i>Kocuria marina</i> LJ29	MG049769.1	86	Lake sediment, China
	1.4LP8	2.00 ± 0.03	<i>Staphylococcus cohnii</i> F	MH591774.1	99	India
	1.4LP11	1.20 ± 0.01	<i>Brevibacillus</i> sp.	MH683147.1	99	Soil, South Korea
	1.4LP12	1.20 ± 0.02	Firmi-58	N/A		
	2.1LP1	1.10 ± 0.05	<i>Bacillus licheniformis</i> KA9	KF424266.1	99	Hot spring water, Pakistan
	2.1LP3	1.67 ± 0.01		N/A		
	2.1LP4	3.33 ± 0.04	<i>Brevibacillus brevis</i> ABS9	KU973528.1	88	Soil, Egypt
	2.1LP5	1.30 ± 0.02	<i>Brevibacillus</i> sp. WJP	AB938197.1	91	Waste water, China
	2.4LP1	2.14 ± 0.06	<i>Brevibacillus</i> sp. WJP	AB938197.1	88	Waste water, China
	3.2LP2	2.60 ± 0.06	<i>Bacillus subtilis</i> AS12	MF497446.1	98	Heat rhizosphere, Egypt

ตารางที่ 11 การจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส อะไมเลส โปรตีเอส และไลเปส ด้วยเทคนิค 16S rRNA sequencing (ต่อ)

เอินไซม์	ไอโซเลท	Halo : Colony ratios	Closest relative ^a	Accession No. ^b	% Identity ^c	Origin ^d
	3.2LP3	2.00 ± 0.02	<i>Micrococcus</i> sp. HEXBA06	JQ658425.1	98	Todos os Santos Bay oil contaminated
	3.2LP5	1.66 ± 0.01	<i>Staphylococcus</i> sp. CLC-M8	MH518230.1	98	Mangrove, Brazil China
	3.3LP1	4.67 ± 0.03	<i>Bacillus</i> sp. DG12	JN208202.1	99	Soil, India
	3.3LP4	1.44 ± 0.04	<i>Bacillus</i> <i>amyloliquefaciens</i> BA- KA4	MK336717.1	98	Soil, China
	3.3LP5	3.33 ± 0.04	<i>Staphylococcus</i> sp. CLC-F2	MH518187.1	99	China
	3.3LP7	2.75 ± 0.04	<i>Staphylococcus</i> sp. CLC-F2	MH518187.1	99	China

ตารางที่ 11 การจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส อะไมเลส โปรตีเอส และไลเปส ด้วยเทคนิค 16S rRNA sequencing (ต่อ)

เอ็นไซม์	ไอโซเลท	Halo : Colony ratios	Closest relative ^a	Accession No. ^b	% Identity ^c	Origin ^d
	3.3LP8	2.00 ± 0.04	<i>Staphylococcus</i> sp. CLC-F2	MH518187.1	99	China
	3.5LP2	2.25 ± 0.02	<i>Micrococcus</i> <i>yunnanensis</i> SML_M164	MG937693.1	99	N/A, USA

หมายเหตุ : ^a Closest species with highest % identity and highest Max score on BLAST search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)

^b GenBank accession no. of strains on NCBI website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)

^c Based on BLAST-search results, identity (%) of strains compared to the closest relatives.

^d Based on BLAST-search results, origin of the closest relatives

N/A = Not Available

4.4 กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรไลติก

4.4.1 แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

1) ความสามารถของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง

จากการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสด้วยวิธีการเกลี่ยเชื้อบนอาหารแข็ง CMC ซึ่งแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจะย่อยสารตั้งต้น CMC ซึ่งจำเป็นต้องอาศัยสารละลาย 0.1% congo red ในการสังเกตวงใสรอบๆ โคลินี โดย Nargotra *et al.* (2016) กล่าวว่าเนื่องจากสารละลาย congo red จะเข้าจับกับบริเวณพันธะ β -1,4 glycosidic ที่มีอยู่ในอาหารแข็ง CMC หากแบคทีเรียมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจะย่อย CMC ซึ่งเป็นสารตั้งต้นทำให้เกิดบริเวณส่วนใสรอบๆ โคลินี (ภาพที่ 8) ซึ่งผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่คัดแยกได้จากดินในป่านาสีนวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม มีจำนวน 7 ไอโซเลท มีค่า Halo : colony ratios อยู่ในช่วง 1.2-2.6 (ตารางที่ 7) หลังบ่มเชื้อแบคทีเรียนาน 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 8 โคลินีของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสย่อยเซลลูโลสบนอาหารแข็ง CMC

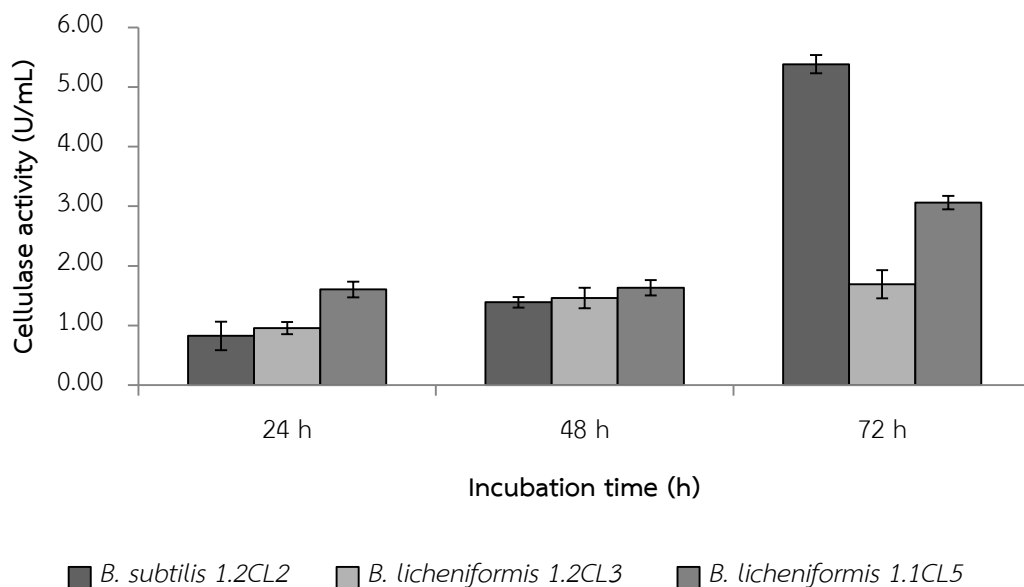
2) ความสามารถของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว

เอนไซม์เซลลูเลสจัดเป็นเอนไซม์ที่ต้องอาศัยสารตั้งต้นมากระตุ้นเพื่อให้เกิดการสร้างหรือผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขึ้นมาโดยสารตั้งต้นที่จำเพาะกับเอนไซม์ ซึ่งผลทดลองจากข้อ (1) คัดเลือกแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่มีค่า Halo : colony ratios สูงที่สุด 3 อันดับแรก มาเหนี่ยวนำให้ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในอาหารเหลวที่มีความเข้มข้นของสารตั้งต้น 1% CMC บ่มในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ (ตารางที่ 12) ผลการวิจัยพบว่าแบคทีเรียที่มีกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุด 3 อันดับแรก ได้แก่ *Bacillus subtilis* 1.2CL2 มีกิจกรรมของเอนไซม์ เซลลูเลสสูงที่สุดเท่ากับ 5.38 ± 0.15 ยูนิต/มิลลิลิตร รองลงมาคือ *Bacillus licheniformis* 1.1CL5 มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 3.06 ± 0.11 ยูนิต/มิลลิลิตร และ *Bacillus licheniformis* 1.2CL3 มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 1.69 ± 0.24 ยูนิต/มิลลิลิตร หลังบ่มนาน 72 ชั่วโมง (ภาพที่ 9)

ตารางที่ 13 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ หลังบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง

สายพันธุ์	ระยะเวลาการบ่ม (ชั่วโมง), ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน		
	24	48	72
<i>Bacillus subtilis</i> 1.2CL2	$1.39^{bB} \pm 0.09$	$0.83^{cB} \pm 0.24$	$5.38^{aA} \pm 0.15$
<i>Bacillus licheniformis</i> 1.2CL3	$1.46^{bB} \pm 0.17$	$1.69^{aB} \pm 0.12$	$0.95^{cA} \pm 0.10$
<i>Bacillus licheniformis</i> 1.1CL5	$1.60^{bB} \pm 0.13$	$1.63^{bB} \pm 0.12$	$3.06^{aA} \pm 0.11$

หมายเหตุ : อักษร ^{a,b,c} ที่แตกต่างกันในแนวแถว (สายพันธุ์) และอักษร ^{A,B,C} ที่แตกต่างกันในแนวคอลัมน์ (ระยะเวลาการบ่ม) แสดงว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



ภาพที่ 9 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดยเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* 1.2CL2 *B. licheniformis* 1.2CL3 และ *B. licheniformis* 1.1CL5 หลังเหนี่ยวนำในอาหารเหลวที่มี 1% CMC เป็นสารตั้งต้น

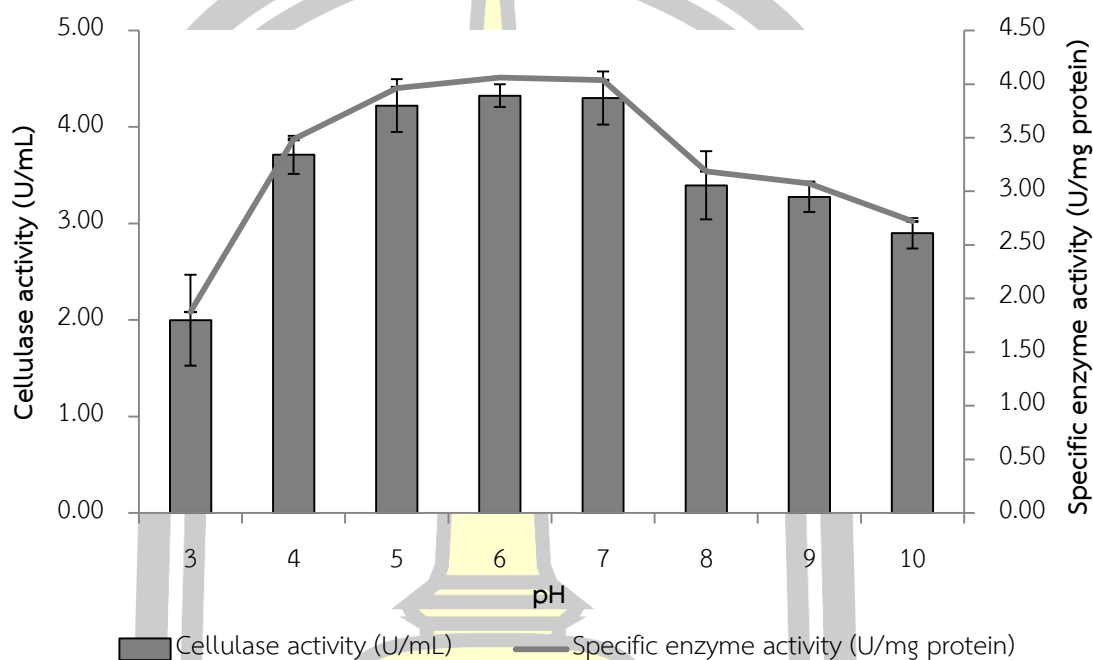
3) การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส

แบคทีเรียที่คัดกรองได้คือ *B. subtilis* 1.2CL2 ซึ่งให้กิจกรรมเอนไซม์และ กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุด

3.1) ผลของ pH ต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

ทดสอบโดยใช้ crude enzyme ของเชื้อ *B. subtilis* 1.2CL2 ที่ ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี 1% CMC บ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง และทำให้เข้มข้นโดยใช้ Ultracentrifuge protein concentrator (Molecular weight cut-off 10 kDa) บ่ม crude enzyme ในบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมโดยควบคุม pH ตั้งแต่ 3 4 5 6 7 8 9 และ 10 ตามลำดับ

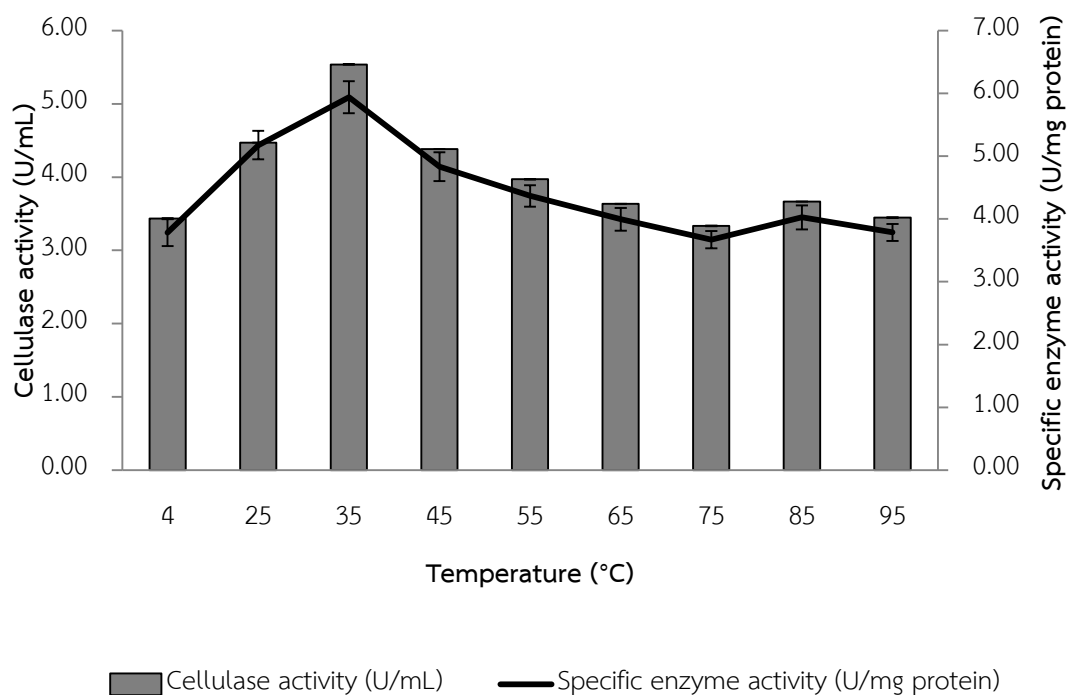
บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยเชื้อ *B. subtilis* 1.2CL2 มีกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุดเท่ากับ 4.33 ± 0.12 หน่วย/มิลลิลิตร และค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงที่สุดเท่ากับ 4.06 ± 0.69 หน่วย/มิลลิกรัมโปรตีน ที่ pH 6 (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสและกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อ *B. subtilis* 1.2CL2 หลังบ่มในบัฟเฟอร์ที่ pH ต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที

3.2) ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

เมื่อบ่ม crude enzyme ของ *B. subtilis* 1.2CL2 ใน pH 6 (จากสภาวะที่คัดเลือกได้ก่อนหน้า) โดยควบคุมที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 4 25 35 45 55 65 75 85 และ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่า *B. subtilis* 1.2CL2 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์และค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุดเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 5.54 ± 0.00 หน่วย/มิลลิลิตร และมีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 5.94 ± 0.25 หน่วย/มิลลิกรัมโปรตีน



ภาพที่ 11 กิจกรรมของเอนไซม์และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดยเชื้อ *B. subtilis* 1.2CL2 หลังบ่มในอุณหภูมิต่างๆ ที่ pH 6 เป็นเวลา 30 นาที

Shanmugapriya *et al.* (2012) ศึกษาและคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากดินที่ปนเปื้อนมูลของวัว ประเทศอินเดีย ซึ่งแบคทีเรียที่คัดแยกได้คือแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. และสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้ CMC เป็นสารตั้งต้นในการเหนี่ยวนำให้ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าว ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุดเท่ากับ 6.00 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน หลังบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (pH 6)

Sethi *et al.* (2013) ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียที่แยกได้จากดินในประเทศอินเดีย ผลการคัดแยกเชื้อพบแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Pseudomonas fluorescens* *Bacillus subtilis* *E. coli* และ *Serratia marcescens* ซึ่ง *Pseudomonas fluorescens* คือแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุดในสภาวะที่เหมาะสมคือ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (pH 10)

Praveen and Sharmishtha (2017) คัดแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสจากแหล่งดินและศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสม ในประเทศอินเดีย โดยเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มี 1%

CMC เป็นสารตั้งต้น ผลการวิจัยพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus thuringiensis* เป็นแบคทีเรียที่มีกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุดในอุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสม คือ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (pH 7)

Naresh *et al.* (2019) คัดการแยกแบคทีเรียที่เรื้อนร้อนที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากดินในป่าชายเลนเขตร้อนตอนเหนือของประเทศมาเลเซีย สามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและทนร้อนได้ทั้งหมด 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Anoxybacillus Bacillus subtilis* และ *Paenibacillus dendritiformis* แต่ *Anoxybacillus* เป็นสายพันธุ์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุดในอุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสม คือ อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส (pH 6)

จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสแต่ส่วนใหญ่แบคทีเรียสกุล *Acetivibrio Bacillus Bacteroides Cellulomonas Cellvibrio Clostridium Micrococcus Paenibacillus Pseudomonas* และ *Ruminococcus* โดยเฉพาะแบคทีเรียสายพันธุ์ *B. subtilis B. cereus B. altitudinis* และ *Paenibacillus sp.* เป็นแบคทีเรียที่พบมากในดินอีกทั้งยังสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดี และผลการระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่คัดแยกจากดินในพื้นที่ป่านาสีนวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม ประเทศไทย พบว่าส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus spp.* (ตารางที่ 11)

โดยส่วนมากมุลสัตว์ประเภทสัตว์เคี้ยวเอื้องจะมีองค์ประกอบของเซลลูโลสเป็นหลักถึงแม้ว่าสัตว์เคี้ยวเอื้องจะสามารถย่อยเซลลูโลส แต่ก็ไม่สามารถย่อยได้ทั้งหมดจึงจำเป็นต้องอาศัยเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียในลำไส้สัตว์ช่วยย่อยสลายเซลลูโลส ซึ่งผลของการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากตัวอย่างดินที่เก็บมานั้นสามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่มีกิจกรรมเอนไซม์และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุดคือ *Bacillus subtilis* 1.2CL2 ซึ่งมาจากตัวอย่างดินจุดที่ 1.2 (N 16 20 17.945, E 103 12 14.731) ที่พบต้นสมอไทย ต้นตอง และพบปลวก มีค่า pH เท่ากับ 7.72 บริเวณดังกล่าวสภาพแวดล้อมอุดมไปด้วยต้นไม้และการทับถมกันของซากใบไม้ ทั่วไปแล้วเมื่อมีการทับถมของซากพืชหรือเศษใบไม้เป็นจำนวนมากมักจะพบกิจกรรมของจุลินทรีย์กลุ่มที่มีความสามารถในการย่อยเซลลูโลส (cellulolytic bacterial) เนื่องจากเซลลูโลสเป็นโครงสร้างหลักของพืช ซึ่งกระตุ้นให้แบคทีเรียเกิดการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่สูงขึ้นตามมาเพื่อย่อยสลายซากใบไม้ที่มีองค์ประกอบของโมเลกุลคาร์บอนส่งผลให้เกิดการหมุนเวียนของแร่ธาตุและเกิดเป็นวัฏจักรต่อไป ซึ่ง *Bacillus subtilis* 1.2CL2 ที่คัดเลือกได้นั้นมีสายพันธุ์ใกล้เคียงกับ *Bacillus subtilis* มีเปอร์เซ็นต์ความใกล้เคียงร้อยละ 99 (accession no. KY285265.1) และมีต้นกำเนิดมาจากดินในประเทศชูดาน (ตารางที่ 11)

4.4.2 แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส

1) ความสามารถของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสเมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง

จากการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสด้วยวิธีการเกลี่ยเชื้อบนอาหารแข็ง starch โดยแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสจะย่อยสารตั้งต้นที่เป็นแป้งบนอาหารแข็งและจะปรากฏบริเวณส่วนใสรอบๆ โคลินี (ภาพที่ 12) ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียผลิตเอนไซม์อะไมเลสที่คัดแยกได้จากดินในป่านาสีนวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม มีจำนวน 32 ไอโซเลท มีค่า Halo : colony ratios อยู่ในช่วง 1.1-2.5 (ตารางที่ 8) หลังบ่มเชื้อแบคทีเรียนาน 72 ชั่วโมง

ภาพที่ 12 โคลินีของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสย่อยแป้งบนอาหารแข็ง starch



ตารางที่ 14 กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสของแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ หลังบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง

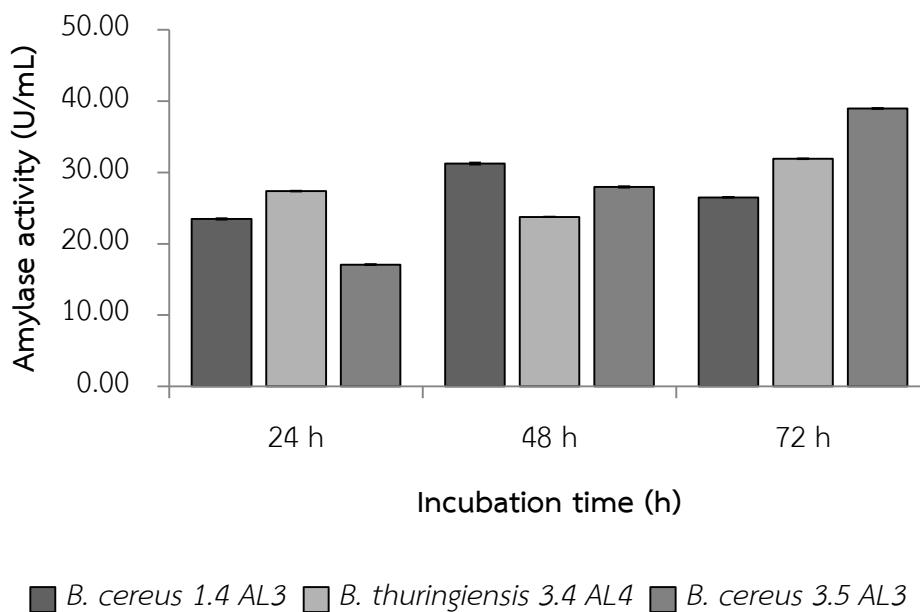
สายพันธุ์	ระยะเวลาการบ่ม (ชั่วโมง), ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน		
	24	48	72
<i>Bacillus cereus</i> 1.4 AL3	23.48 ^{bB} \pm 7.22	33.37 ^{aAB} \pm 13.75	26.51 ^{aA} \pm 2.59
<i>Bacillus thuringiensis</i> 3.4 AL4	27.37 ^{aB} \pm 2.71	23.77 ^{bAB} \pm 1.73	33.58 ^{aA} \pm 5.52
<i>Bacillus cereus</i> 3.5 AL3	17.07 ^{cB} \pm 1.39	27.95 ^{bAB} \pm 5.40	38.98 ^{aA} \pm 3.10

หมายเหตุ : อักษร ^{a,b,c} ที่แตกต่างกันในแนวแถว (สายพันธุ์) และอักษร ^{A,B,C} ที่แตกต่างกันในแนวคอลัมน์ (ระยะเวลาการบ่ม) แสดงว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

2) ความสามารถของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว

จากผลการทดลองในข้อ (1) แบคทีเรียที่มีค่า Halo : colony ratios สูงที่สุดเป็น 3 อันดับแรก จะถูกนำมาทดสอบในอาหารเหลวที่มีความเข้มข้นของ 1% สารละลายแป้งบ่มเป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ (ตารางที่ 13) ที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยผลการทดลองสามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงที่สุด 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus cereus* 3.5AL3 มีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูงที่สุดเท่ากับ 38.98 ± 3.11 หน่วย/มิลลิลิตร รองลงมาคือ *Bacillus thuringiensis* 3.4AL4 มีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 31.92 ± 2.66 หน่วย/มิลลิลิตร และ *Bacillus cereus* 1.4AL3 มีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 26.51 ± 2.59 หน่วย/มิลลิลิตร ตามลำดับ หลังบ่มที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง (ภาพที่ 13)

พูน ปณ ทิโต ชเว



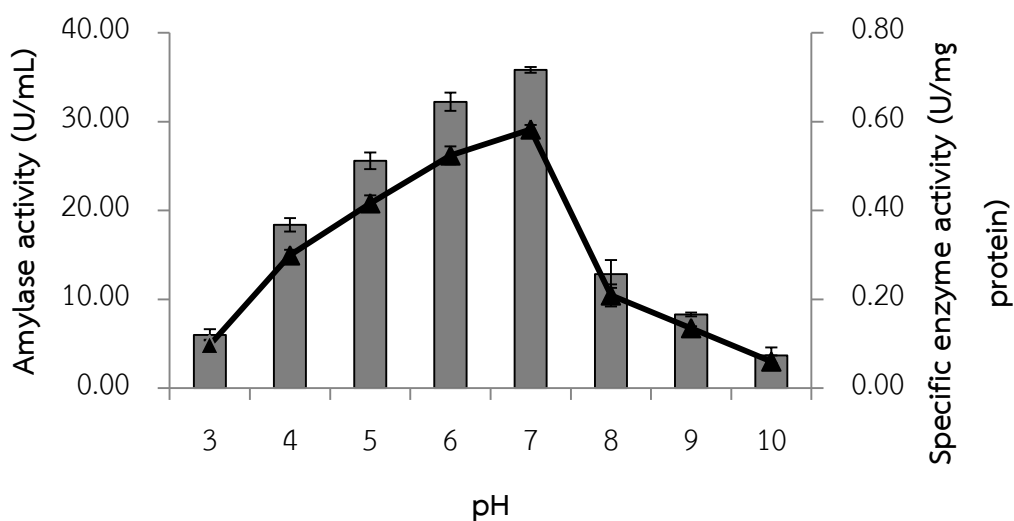
ภาพที่ 13 กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตโดยเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* 1.4AL3 *B. thuringiensis* 3.4AL4 และ *B. cereus* 3.5AL3 หลังเหนี่ยวนำในอาหารเหลวที่มี 1% สารละลายแป้งเป็นสารตั้งต้น

3) การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส

แบคทีเรียที่คัดกรองได้คือ *B. cereus* 3.5AL3 ซึ่งให้กิจกรรมเอนไซม์และ กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์อะไมเลสสูงที่สุด

3.1) ผลของ pH ต่อกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

ทดสอบโดยใช้ crude enzyme ของเชื้อ *B. cereus* 3.5AL3 ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี 1% สารละลายแป้ง บ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง และทำให้เข้มข้นโดยใช้ Ultracentrifuge protein concentrator (Molecular weight cut-off 10 kDa) บ่ม crude enzyme ในบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมโดยควบคุม pH ตั้งแต่ 3 4 5 6 7 8 9 และ 10 ตามลำดับ ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส บ่มเป็นเวลา 30 นาที โดยเชื้อ *B. cereus* 3.5AL3 มีกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสสูงที่สุดเท่ากับ 35.84 ± 0.33 ยูนิต/มิลลิลิตร และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงที่สุดเท่ากับ 0.58 ± 0.01 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีนที่ pH 7 (ภาพที่ 14)



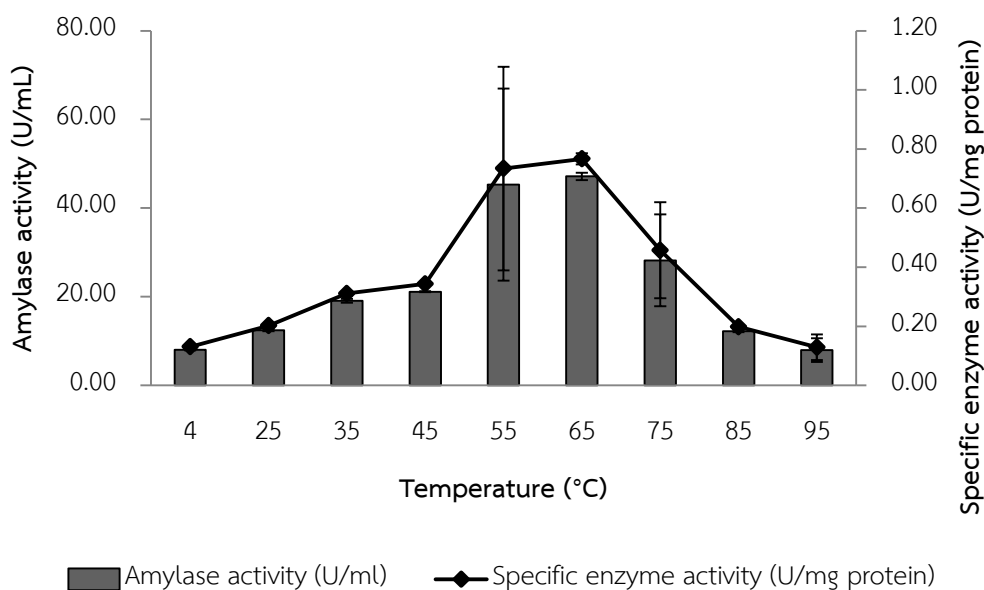
■ Amylase activity (U/ml) ▲ Specific enzyme activity (U/mg protein)

ภาพที่ 14 กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสและกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตโดยเชื้อ *B. cereus* 3.5AL3 หลังบ่มในบัฟเฟอร์ที่ pH ต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที

3.2) ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส

เมื่อบ่ม crude enzyme ของ *B. cereus* 3.5AL3 ใน pH 7 (จากสภาวะที่คัดเลือกได้ก่อนหน้านี้) โดยควบคุมที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 4 25 35 45 55 65 75 85 และ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่า *B. cereus* 3.5AL3 มีกิจกรรมเอนไซม์และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์อะไมเลสสูงที่สุดเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 47.15 ± 0.82 ยูนิต/มิลลิลิตร และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 0.77 ± 0.02 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน (ภาพที่ 15)

พหุบัณฑิต ชีวะ



ภาพที่ 15 กิจกรรมเอนไซม์และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อ *B. cereus* 3.5AL3 หลังบ่มในอุณหภูมิต่างๆ ที่ pH 7 เป็นเวลา 30 นาที

จากการศึกษาครั้งนี้เชื้อ *B. cereus* 3.5AL3 เป็นเชื้อแบคทีเรียทนต่ออุณหภูมิค่อนข้างสูง จากการรายงานของ Arikan (2008) พบว่า *Bacillus* sp. ที่แยกได้จากปุ๋ยหมักนั้นเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถทนความร้อนและทนต่อสภาวะความเป็นด่างสูง และสภาวะที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวผลิตเอนไซม์อะไมเลส คือ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในขณะเดียวกันรายงานของ Mishra และ Behera (2008) กล่าวถึงเอนไซม์อะไมเลสสามารถทนความร้อนได้ในช่วงอุณหภูมิ 50-70 องศาเซลเซียส แม้ว่าในช่วงอุณหภูมิดังกล่าวจะเป็นอันตรายต่อเซลล์แบคทีเรียก็ตาม จากการศึกษาครั้งนี้เชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* 3.5AL3 นี้สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสในสภาวะที่ทนต่อความร้อนสูงที่เป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมต่างๆ

แหล่งที่พบเอนไซม์อะไมเลสสามารถพบได้ทั้งใน พืช สัตว์ หรือจุลินทรีย์จากบริเวณแหล่งดินจุดที่ 3.5 (N 16 20 36, E 103 12 36) ซึ่งเป็นบริเวณที่พบเห็ดไคโคล (ชุกตึก 15 ซม.) ค่า pH เท่ากับ 5.39 ซึ่งเป็นบริเวณที่พบเชื้อ *B. cereus* 3.5AL3 ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์อะไมเลสสูงที่สุดดังที่กล่าวมาข้างต้นนั้น เมื่อจุลินทรีย์มีกิจกรรมในการย่อยสลายอะไมโลสหรือโมเลกุลของแป้งที่อาจปะปนอยู่ในบริเวณแหล่งดินดังกล่าวจากซากเห็ดที่เน่าเปื่อยจึงทำให้เกิดการผลิตเอนไซม์อะไมเลสขึ้นมาเพื่อเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพเพื่อให้กลไกการย่อยสลายเป็นไปอย่างสมบูรณ์ และเนื่องจากดินรอบๆ บริเวณดังกล่าว pH ค่อนข้างเป็นด่าง ซึ่งเอื้อต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ของแบคทีเรีย

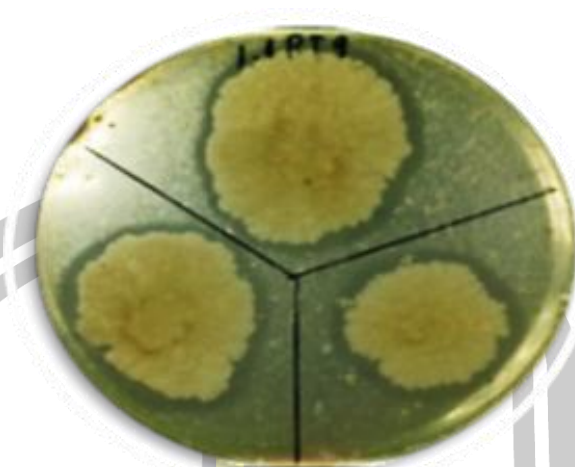
จากการรายงานก่อนหน้าของ Gebreselema (2015) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแบคทีเรียที่แยกได้จากดินบริเวณมหาวิทยาลัย โดยเพาะเลี้ยง *Bacillus* spp. ในอาหารเหลวที่มี 0.1% สารละลายแป้ง บ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ตั้งแต่ 25-45 องศาเซลเซียส พบว่า *Bacillus* spp. มีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูงที่สุดเท่ากับ 3.5 ยูนิต/มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (pH 7) สอดคล้องกับการรายงานของ Vaidya and Rathore (2015) ที่กล่าวว่าสภาวะที่เหมาะสมของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินคืออุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (pH 7) โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 1.09 ± 0.01 ไมโครโมลาร์/มิลลิลิตร.นาที่ และ 5.07 ± 0.02 ไมโครโมลาร์/มิลลิลิตร.นาที่ ตามลำดับ ซึ่งผลการศึกษารั้งนี้เชื้อ *B. cereus* 3.5AL3 ที่คัดเลือกได้มีกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสที่สูงกว่า (47.15 ± 0.82 ยูนิต/มิลลิลิตร) หลังบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส (pH 7)

แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp. เช่น *Bacillus amyloliquefaciens* *B. subtilis* *B. licheniformis* และ *B. stearothermophilus* มักนิยมใช้กันทั่วไปในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสที่อุณหภูมิ 37-60 องศาเซลเซียส (Asgher *et al.*, 2007) และใช้กันอย่างแพร่หลายในเชิงพาณิชย์ และทางอุตสาหกรรม ได้แก่ อุตสาหกรรมผลิตเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ อุตสาหกรรมผลิตซ็อกโกแลต อุตสาหกรรมผลิตสิ่งทอ เป็นต้น ทั้งนี้ปัจจัยมีผลต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตเอนไซม์อะไมเลส ได้แก่ pH อัตราการกวน กระบวนการหมักที่เหมาะสม แหล่งพลังงานที่เหมาะสม หรือแม้กระทั่งกระบวนการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์มักเป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการกระตุ้นการผลิตเอนไซม์อะไมเลสที่มีประสิทธิภาพได้ (Naidu, 2013) นอกจากนี้เอนไซม์อะไมเลสที่ได้จากเชื้อราและยีสต์บางชนิด เช่น *Rhizopus* sp. *Aspergillus niger* *A. oryzae* *A. candidus* และ *Candida* sp. ก็มีบทบาทสำคัญในภาคอุตสาหกรรมเช่นกัน

4.4.3 แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอส

1) ความสามารถของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสเมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง

จากการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสด้วยวิธีการเกลี่ยเชื้อบนอาหารแข็ง skim milk ผลการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสเพื่อย่อยสารตั้งต้นคือ เคซีน ซึ่งเป็นโปรตีนในนม โดยสังเกตจากการบริเวณส่วนใสรอบๆ โคลนีย์ของแบคทีเรีย (ภาพที่ 16) หากบริเวณส่วนใส่ยิ่งกว้างแสดงว่าไอโซเลทนั้นๆ มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้ดี ซึ่งค่า Halo : colony ratios ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 41 ไอโซเลท อยู่ในช่วง 1.1-2.9 (ตารางที่ 9) หลังบ่มเชื้อแบคทีเรีนาน 48 ชั่วโมง



ภาพที่ 16 โคโลนีของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสย่อยเคซีนบนอาหารแข็ง skim milk

2) ความสามารถของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว

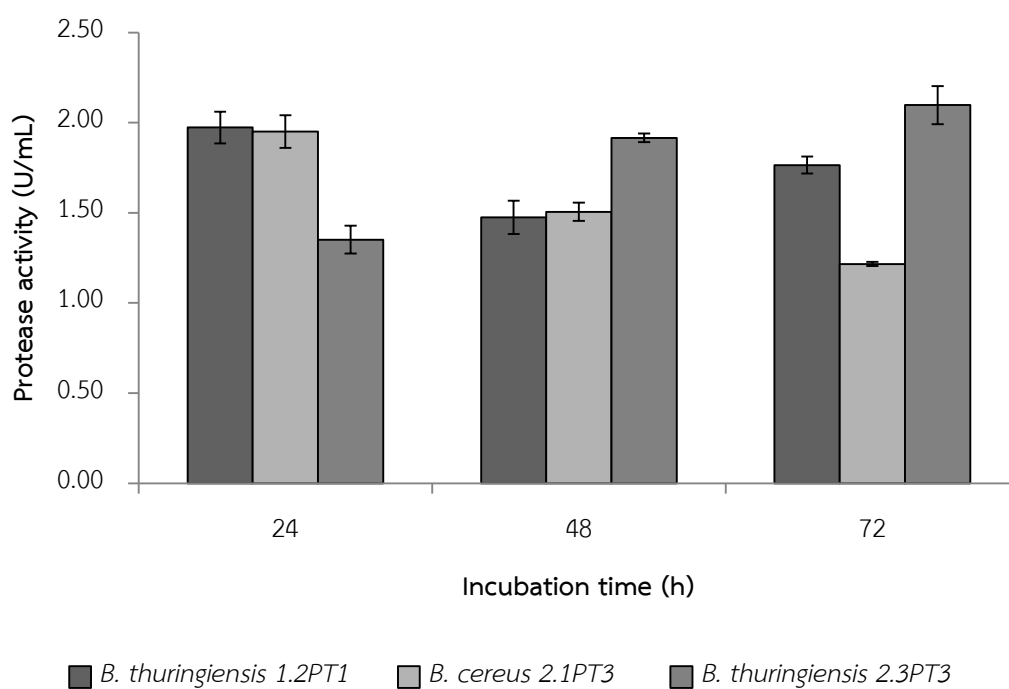
จากผลการทดลองในข้อ (1) แบคทีเรียที่มีค่า Halo : colony ratios สูงที่สุดเป็น 3 อันดับแรก จะถูกนำมาทดสอบในอาหารเหลวที่มีความเข้มข้นของ 1% สารละลายเคซีน บ่มเป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ (ตารางที่ 14) ที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยผลการทดลองสามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสสูงที่สุด 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus thuringiensis* 2.3PT3 มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสเท่ากับ 2.10 ± 0.11 ยูนิต/มิลลิลิตร รองลงมาคือ *Bacillus thuringiensis* 1.2PT1 มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสเท่ากับ 1.76 ± 0.05 ยูนิต/มิลลิลิตร และ *Bacillus cereus* 2.1PT3 มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสเท่ากับ 1.22 ± 0.01 ยูนิต/มิลลิลิตร ตามลำดับ หลังบ่มที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง (ภาพที่ 17)

พหุ ประถมศึกษา ชีวะ

ตารางที่ 15 กิจกรรมเอนไซม์โปรตีเอสของแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ หลังบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง

สายพันธุ์	ระยะเวลาการบ่ม (ชั่วโมง), ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน		
	24	48	72
<i>Bacillus thuringiensis</i> 1.2PT1	1.97 ^{aA} \pm 0.08	1.47 ^{bB} \pm 0.09	1.76 ^{aA} \pm 0.04
<i>Bacillus cereus</i> 2.1PT3	1.95 ^{aA} \pm 0.08	1.50 ^{bB} \pm 0.04	1.21 ^{bA} \pm 0.01
<i>B. thuringiensis</i> 2.3PT3	1.35 ^{bA} \pm 0.07	1.91 ^{aB} \pm 0.02	1.78 ^{aA} \pm 0.34

หมายเหตุ : อักษร ^{a,b,c} ที่แตกต่างกันในแนวแถว (สายพันธุ์) และอักษร ^{A,B,C} ที่แตกต่างกันในแนวคอลัมน์ (ระยะเวลาการบ่ม) แสดงว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



ภาพที่ 17 กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสที่ผลิตโดยเชื้อแบคทีเรีย *B. thuringiensis* 1.2PT1 *B. cereus* 2.1PT3 และ *B. thuringiensis* 2.3PT3 หลังเหนี่ยวนำในอาหารเหลวที่มี 1% สารละลายเคซีนเป็นสารตั้งต้น

การทดสอบหากิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสนิยมใช้เคซีนเป็นสารตั้งต้น โดยปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์โปรตีเอสกับสารตั้งต้นเคซีนจะเกิดจากการที่เอนไซม์โปรตีเอสย่อยเคซีนที่มีอยู่ในอาหาร จากนั้นกรดอะมิโนไทโรซีนจะถูกปลดปล่อยออกมาพร้อมกับเปปไทด์อื่นๆ และสารเคมีที่มีความสำคัญในการตรวจวัดหากิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสคือ สารละลาย Folin -Ciocalteus Phenol หรือสาร Folin เมื่อทำปฏิกิริยากับไทโรซีนจะเปลี่ยนสีของสารละลายจากสีเหลืองเป็นสีน้ำเงิน ซึ่งสามารถวัดปริมาณและวัดเป็นค่าการดูดกลืนแสงผ่านเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ยิ่งมีการปลดปล่อยกรดอะมิโนไทโรซีนมากเท่าไรก็ยิ่งมีการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสมากขึ้นเท่านั้น (Cupp-enyard, 2008)

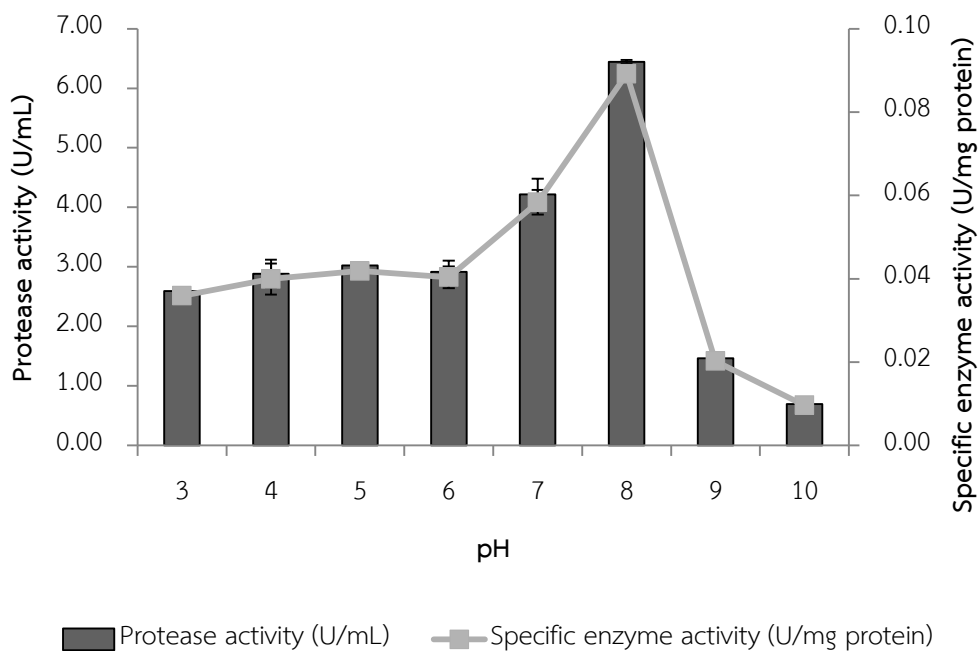
3) การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของกิจกรรมเอนไซม์โปรตีเอส

แบคทีเรียที่คัดกรองได้คือ *B. thuringiensis* 2.3PT3 ซึ่งให้กิจกรรมเอนไซม์และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรตีเอสสูงที่สุด

3.1) ผลของ pH ต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส

ทดสอบโดยใช้ crude enzyme ของเชื้อ *B. thuringiensis* 2.3PT3 ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี 1% สารละลายเคซีน บ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง และทำให้เข้มข้นโดยใช้ Ultracentrifuge protein concentrator (Molecular weight cut-off 10 kDa) บ่ม crude enzyme ในบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมโดยควบคุม pH ตั้งแต่ 3 4 5 6 7 8 9 และ 10 ตามลำดับ ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส บ่มเป็นเวลา 30 นาที โดยเชื้อ *B. thuringiensis* 2.3PT3 มีกิจกรรมเอนไซม์โปรตีเอสสูงที่สุดเท่ากับ 6.44 ± 0.03 ยูนิต/มิลลิลิตรและกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงที่สุดเท่ากับ 0.09 ± 0.00 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีนที่ pH 8 (ภาพที่ 18)

พูนุ ปณุกิตโต ชีเว

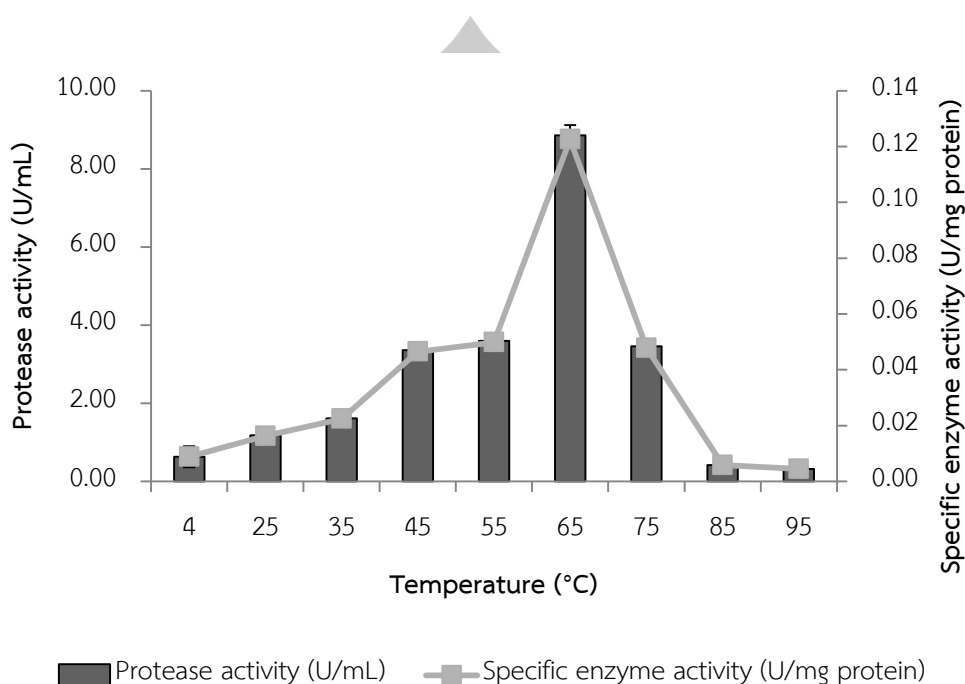


ภาพที่ 18 กิจกรรมเอนไซม์โปรตีเอสและกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรตีเอสที่ผลิตโดยเชื้อ *B. thuringiensis* 2.3PT3 หลังบ่มในบัฟเฟอร์ที่ pH ต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที

3.2) ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส

เมื่อบ่ม crude enzyme ของ *B. thuringiensis* 2.3PT3 ใน pH 8 (จากสถานะที่คัดเลือกได้ก่อนหน้านี้) โดยควบคุมที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 4 25 35 45 55 65 75 85 และ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่า *B. thuringiensis* 2.3PT3 มีกิจกรรมเอนไซม์และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรตีเอสสูงที่สุดเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส pH 8 โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสเท่ากับ 8.86 ± 0.26 ยูนิต/มิลลิลิตร และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 0.12 ± 0.00 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน (ภาพที่ 19)

พหุบัน ปณฺ ทิโต ชีเว



ภาพที่ 19 กิจกรรมเอนไซม์โปรตีเอสและกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรตีเอสที่ผลิตโดยเชื้อ *B. thuringiensis* 2.3PT3 หลังบ่มในบัฟเฟอร์ pH 8 ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที

Alkaline protease หรือมีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า Serine Protease ทัวไปแล้วเอนไซม์ชนิดนี้จะสามารถทำงานได้ดีในช่วง pH 7-11 จากรายงานของ Boominadhan *et al.* (2009) รายงานว่า สภาวะที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสสูงสุดของเชื้อ *Bacillus subtilis* *Bacillus amyloliquefaciens* *Bacillus megaterium* และ *Bacillus licheniformis* คือ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และ pH 10 อย่างไรก็ตามแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. มีบทบาทในการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสมากที่สุด ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสคือ อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส pH 8 ซึ่งค่อนข้างจะเป็นต่างและมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดดังภาพที่ 18 และ 19 ตามลำดับ

มีรายงานที่กล่าวถึงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอสคือ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แต่การรายงานครั้งนี้พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินในพื้นที่ป่านาสีนวนสามารถทนความร้อนได้สูงถึง 65 องศาเซลเซียส และสาเหตุที่เอนไซม์มีกิจกรรมลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเนื่องจากเอนไซม์จัดเป็นโปรตีนประเภทหนึ่งเมื่ออยู่ในอุณหภูมิสูงจะทำให้โปรตีนเสียสภาพ การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมจึงมีผลต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส เนื่องจากทั้งอุณหภูมิและ pH

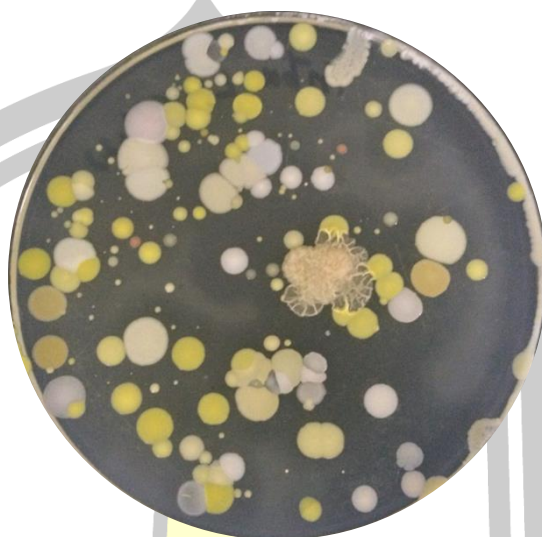
ต่างก็มีผลต่อโครงสร้างของเซลล์แบคทีเรีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสภาวะที่อุณหภูมิสูงจะยิ่งทำให้การละลายออกซิเจนมีค่าต่ำส่งผลให้กระบวนการถอดรหัส mRNA ในการผลิตเอนไซม์เกิดขึ้นได้ไม่ดีเท่าที่ควร ในขั้นตอนของการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ (Enzyme purification) จึงจะสามารถลดปัญหาดังกล่าวได้ โดยมีกระบวนการต่างๆ เข้ามาเกี่ยวข้อง เช่น การตกตะกอนโปรตีน การแยกโดยอาศัยขนาดของโมเลกุล (Gel filtration) เป็นต้น จากการรายงานของ Pant *et al.* (2015) กล่าวว่า เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสมีส่วนแบ่งกับตลาดอุตสาหกรรมโลกสูงถึง 60-65% ซึ่งถือว่าเอนไซม์ชนิดนี้มีความสำคัญต่อทางอุตสาหกรรมไม่น้อยไปกว่าเอนไซม์ชนิดอื่นและสามารถประยุกต์ใช้ได้กับหลายอุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมกระดาษ อุตสาหกรรมผลิตน้ำผลไม้ อุตสาหกรรมซักฟอก เป็นต้น (Zanphorlin *et al.*, 2011)

4.4.4 แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส

1) ความสามารถของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสเมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง

จากการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธีการเกลี่ยเชื้อบนอาหารแข็ง tributyrin ผลการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสเพื่อย่อยสารตั้งต้นคือ tributyrin ซึ่งจัดเป็นไขมันประเภทหนึ่ง โดยสังเกตจากการบริเวณส่วนใสรอบๆ โคโลนีของแบคทีเรีย (ภาพที่ 20) หากบริเวณส่วนใส่งี้กว้าง แสดงว่าไอโซเลทนั้นๆ มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้ดี ซึ่งค่า Halo : colony ratios ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 35 ไอโซเลท อยู่ในช่วง 1.1-4.7 (ตารางที่ 10) หลังบ่มเชื้อแบคทีเรียนาน 72 ชั่วโมง

การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสที่หลั่งออกนอกเซลล์โดยอาศัยการทดสอบบนอาหารแข็ง tributyrin เป็นที่นิยมอย่างมากตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน เนื่องจากเป็นวิธีการตรวจสอบเบื้องต้นที่ง่ายและสะดวก สารตั้งต้น tributyrin ถือเป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้ไขมันมะกอกและน้ำมันปาล์มก็สามารถนำมาเป็นแหล่งคาร์บอนได้ ดังรายงานวิจัยของ Femi-Ola *et al.* (2018) เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจากดินที่ปนเปื้อนน้ำมัน ประเทศไนจีเรีย โดยคัดแยกแบคทีเรียบนอาหารแข็ง tributyrin ที่มีความเข้มข้นของสารตั้งต้น 1% (w/v) tributyrin นอกจากนี้ Hassan *et al.* (2018) กล่าวถึงการใช้ tween 80 เพื่อนำมาเป็นสารตั้งต้นและแหล่งคาร์บอนในการเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสที่คัดแยกจากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันปาล์ม ในประเทศมาเลเซีย



ภาพที่ 20 โคโลนีของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสย่อยไขมันบนอาหารแข็ง tributyrin

2) ความสามารถของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว

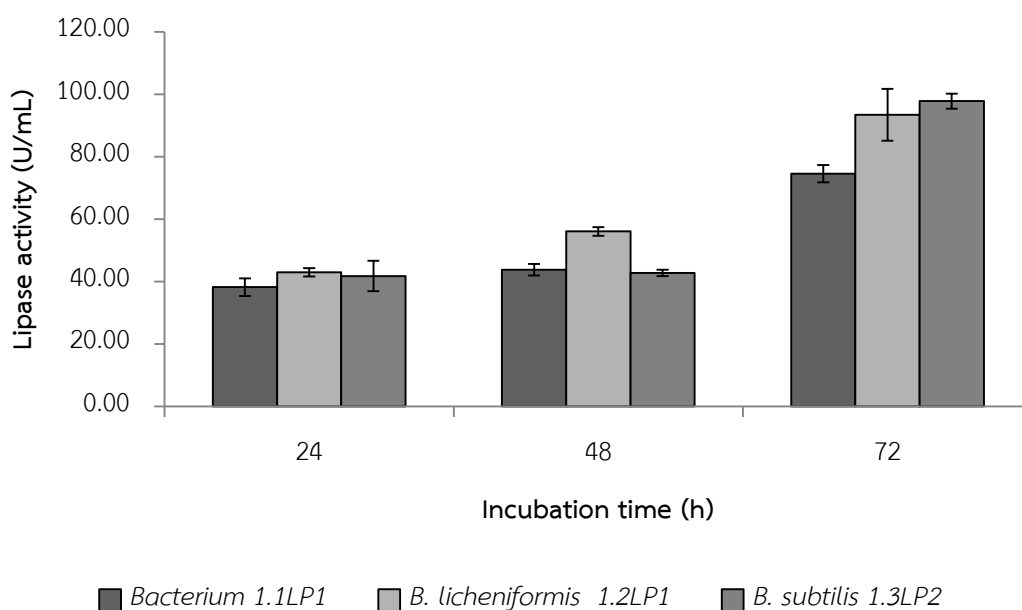
จากผลการทดลองในข้อ (1) แบคทีเรียที่มีค่า Halo : colony ratios สูงที่สุดเป็น 3 อันดับแรก จะถูกนำมาทดสอบในอาหารเหลวที่มีความเข้มข้นของ 1% น้ำมันมะกอก บ่มเป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ (ตารางที่ 15) ที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยผลการทดลองสามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุด 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus subtilis* 1.3LP2 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 97.78 ± 2.41 ยูนิต/มิลลิลิตร รองลงมาคือ *Bacillus licheniformis* 1.2LP1 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 42.77 ± 1.03 ยูนิต/มิลลิลิตร และ *Bacterium* 1.1LP1 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 41.78 ± 4.85 ยูนิต/มิลลิลิตร ตามลำดับ หลังบ่มที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง (ภาพที่ 21)

พหุ ประถมศึกษา ชีวะ

ตารางที่ 16 กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ หลังบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง

สายพันธุ์	ระยะเวลาการบ่ม (ชั่วโมง), ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน		
	24	48	72
<i>Bacterium</i> 1.1LP1	38.23 ^{bc} \pm 2.85	43.76 ^{ab} \pm 1.82	74.54 ^{aA} \pm 2.75
<i>Bacillus licheniformis</i> 1.2LP1	42.96 ^{bc} \pm 1.37	55.74 ^{bB} \pm 0.79	93.40 ^{aA} \pm 8.27
<i>Bacillus subtilis</i> 1.3LP2	41.77 ^{bc} \pm 4.85	42.76 ^{bB} \pm 1.03	97.77 ^{aA} \pm 2.41

หมายเหตุ : อักษร^{a,b,c} ที่แตกต่างกันในแนวแถว (สายพันธุ์) และอักษร^{A,B,C} ที่แตกต่างกันในแนวคอลัมน์ (ระยะเวลาการบ่ม) แสดงว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



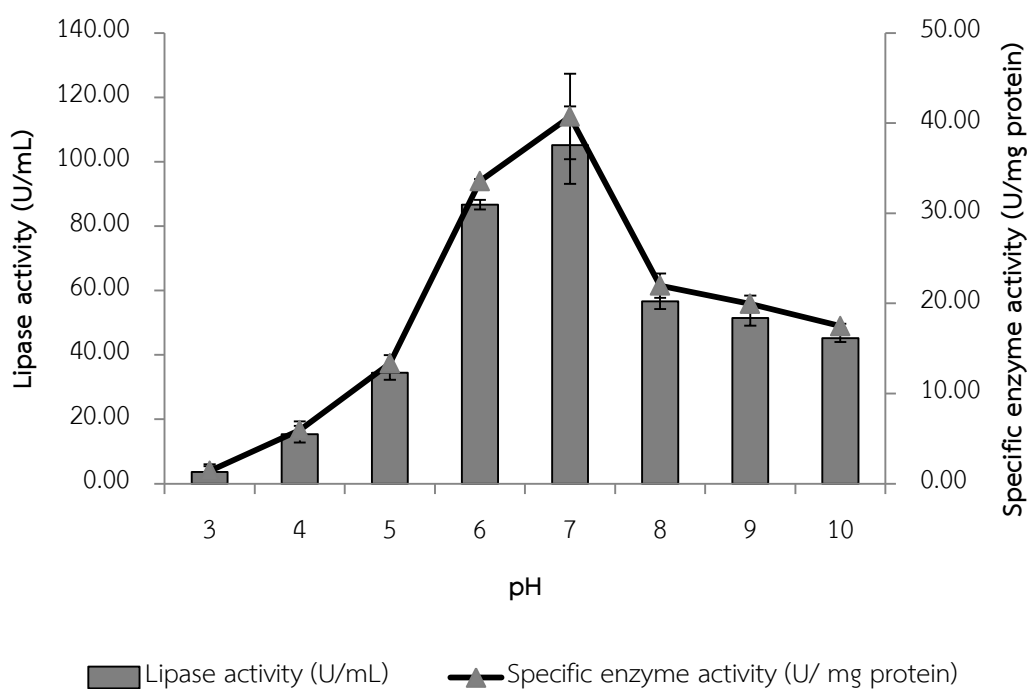
ภาพที่ 21 กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตโดยเชื้อแบคทีเรีย *Bacterium* 1.1LP1 *B. licheniformis* 1.2LP1 และ *B. subtilis* 1.3LP2 หลังเหนี่ยวนำในอาหารเหลวที่มี 1% น้ำมันมะกอกเป็นสารตั้งต้น

3) การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส

แบคทีเรียที่คัดกรองได้คือ *B. subtilis* 1.3LP2 ซึ่งให้กิจกรรมเอนไซม์และ กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุด

3.1) ผลของ pH ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

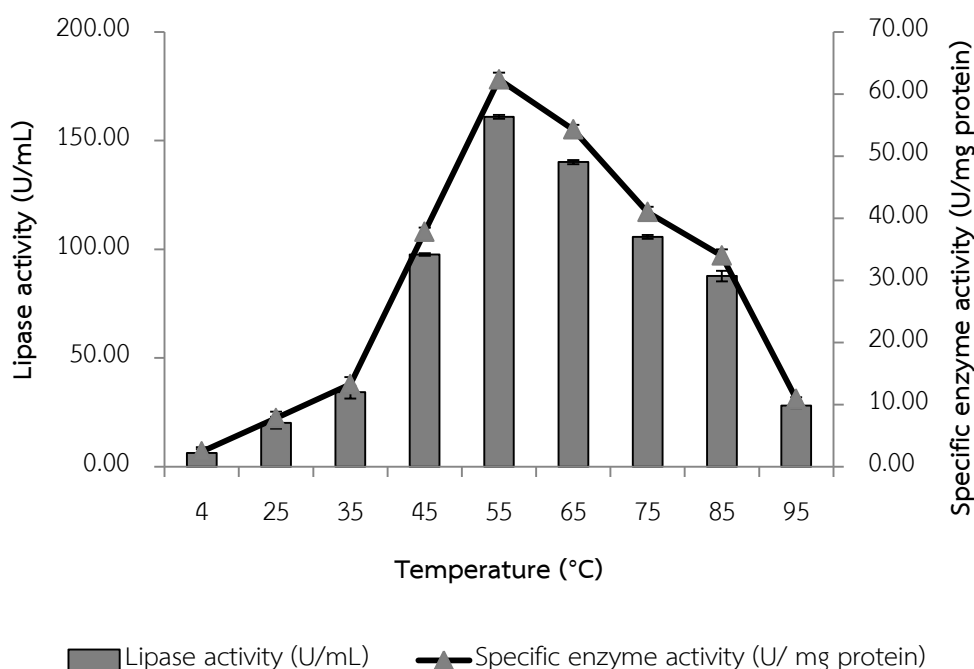
ทดสอบโดยใช้ crude enzyme ของเชื้อ *B. subtilis* 1.3LP2 ที่ ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี 1% น้ำมันมะกอก บ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง และทำให้เข้มข้นโดยใช้ Ultracentrifuge protein concentrator (Molecular weight cut-off 10 kDa) บ่ม crude enzyme ในบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมโดยควบคุม pH ตั้งแต่ 3 4 5 6 7 8 9 และ 10 ตามลำดับ ควบคุม อุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส บ่มเป็นเวลา 30 นาที โดยเชื้อ *B. subtilis* 1.3LP2 มีกิจกรรมเอนไซม์ ไลเปสที่สูงเท่ากับ 105.12 ± 12.04 ยูนิต/มิลลิลิตร และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงที่สุดเท่ากับ 40.73 ± 4.75 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีนที่ pH 7 (ภาพที่ 22)



ภาพที่ 22 กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสและกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตโดยเชื้อ *B. subtilis* 1.3LP2 หลังบ่มในบัฟเฟอร์ที่ pH ต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที

3.2) ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

เมื่อปม crude enzyme ของ *B. subtilis* 1.3LP2 ใน pH 7 (จากสภาวะที่คัดเลือกได้ก่อนหน้านี้) โดยควบคุมที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 4 25 35 45 55 65 75 85 และ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่า *B. subtilis* 1.3LP2 มีกิจกรรมเอนไซม์และ กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุดเมื่อปมที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส โดยมีกิจกรรมของ เอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 160.92 ± 0.91 หน่วย/มิลลิลิตร และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 62.34 ± 1.09 หน่วย/มิลลิกรัมโปรตีน (ภาพที่ 23)



ภาพที่ 23 กิจกรรมเอนไซม์และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อ *B. subtilis* 1.3LP2 หลัง ปมในอุณหภูมิต่างๆ ที่ pH 7 เป็นเวลา 30 นาที

เป็นที่ทราบกันดีว่าจุลินทรีย์เป็นแหล่งผลิต extracellular lipase มากกว่าสัตว์และพืช จากการรายงานของ Hasan and Hameed (2001) กล่าวถึงความสำคัญระหว่างอุณหภูมิและ pH ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. โดยใช้ *p*-nitrophenyl palmitate เป็นสารตั้งต้นในการวัดค่าการดูดกลืนแสงของกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส พบว่าสภาวะที่เหมาะสม ต่างๆ นั้น มักขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ หากจุลินทรีย์สามารถเจริญได้ในสภาวะที่เป็น

ต่างค่า pH ในการอาหารเหลวก็ยอมเป็นสิ่งจำเป็นที่ควรศึกษา ผลการวิจัยครั้งนี้พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสคือ 55 องศาเซลเซียส pH 7 ซึ่งช่วงอุณหภูมิดังกล่าวถือเป็นอุณหภูมิที่ค่อนข้างสูง สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้าของ Markossian *et al.* (2000) ที่คัดแยกเชื้อ *B. thermolepvorans* IHI-91 จากแหล่งน้ำพุร้อนประเทศไอซ์แลนด์ ผลการศึกษาพบว่า *B. thermolepvorans* IHI-91 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีที่สุดในช่วงอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส (pH 6) และจากรายงานของ Sujatha and Dhandayuthapani (2013) กล่าวว่าอุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส คือ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (17.36 ยูนิต/มิลลิลิตร) และ pH 7.5 (18.69 ยูนิต/มิลลิลิตร) เมื่อเทียบกับผลการวิจัยครั้งนี้แล้วกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของเชื้อ *B. subtilis* 1.3LP2 มีค่าสูงกว่าถึงแม้ว่าบ่มที่อุณหภูมิที่สูงกว่าและอาจจะนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ทางอุตสาหกรรมได้

Kumar and Ramalingappa (2018) ศึกษาแบคทีเรียสกุล *Bacillus* sp. ที่คัดแยกได้จากดิน ประเทศอินเดีย ผลการศึกษาพบว่า *Bacillus* sp. สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ประมาณ 30 ยูนิต/มิลลิลิตร หลังบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส pH 7.2 ซึ่งรายงานนี้เป็นอีกหนึ่งรายงานที่ยืนยันได้ว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สามารถนำไปผลิตเอนไซม์ไลเปสเพื่อทางอุตสาหกรรมต่างๆ ได้

Nadaft and Shivasharana (2019) คัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจากตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนน้ำมันในประเทศอินเดีย ผลวิจัยพบว่าเชื้อ *B. subtilis* มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 25 ไมโครโมลาร์.นาท⁻¹มิลลิลิตร⁻¹ หลังบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

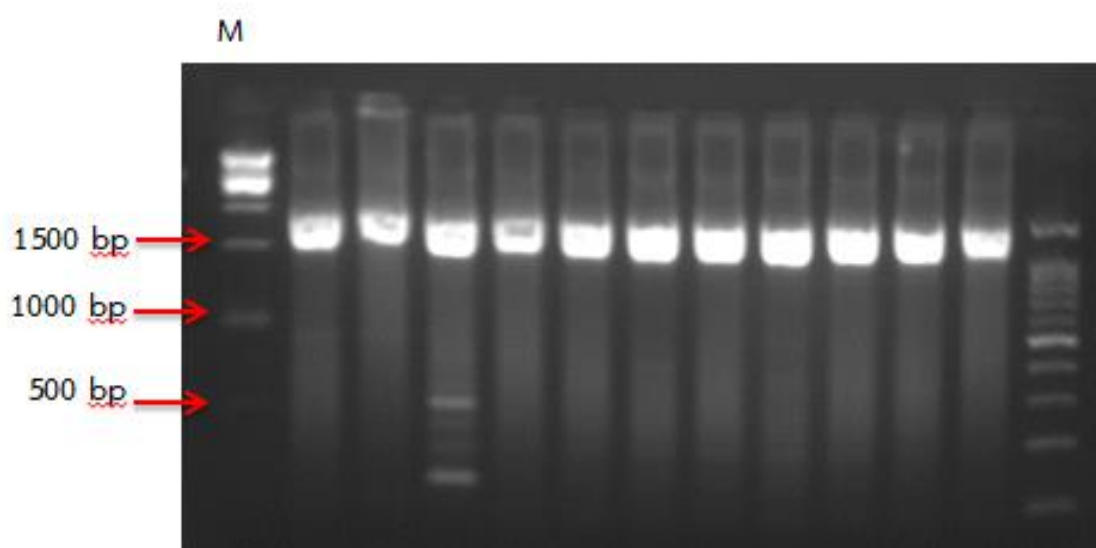
เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตโดยเชื้อแบคทีเรียสามารถทนความร้อนสูงได้และอุตสาหกรรมส่วนใหญ่มักใช้อุณหภูมิสูงในกระบวนการผลิต ซึ่งผลการวิจัยครั้งนี้เชื้อ *B. subtilis* 1.3LP2 ที่คัดแยกได้จากดินในป่านาสีนวนอาจสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในทางอุตสาหกรรมการผลิตเนยแข็ง อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมสารทำความสะอาด การบำบัดน้ำเสียได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ปัจจุบันนี้ เอนไซม์หรือเซลล์จุลินทรีย์ถูกใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพเนื่องจากมีความจำเพาะและข้อได้เปรียบเชิงเศรษฐกิจสูงโดยไม่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมเนื่องจากสาเหตุหลายประการ (1) เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานได้ดีในอุณหภูมิที่รุนแรงและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในสภาวะแวดล้อมต่างๆ จึงมีความเป็นไปได้ที่จะใช้เอนไซม์แทนสถานะและสารเคมีที่รุนแรงจึงเป็นประโยชน์ในการประหยัดพลังงานและป้องกันมลพิษ (2) เอนไซม์มีความจำเพาะกับสารตั้งต้นสูงมาก ทำให้ง่ายต่อการเก็บเกี่ยวผลผลิตหากทราบวัตถุดิบหรือสารตั้งต้นที่จำเพาะกับเอนไซม์ชนิดนั้นๆ (3) การตรึงเอนไซม์สามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่ได้หลายครั้ง (4) เอนไซม์สามารถใช้ในการบำบัดของเสียที่ประกอบด้วยสารที่เป็นอันตรายได้ และ (5) โดยปกติเอนไซม์สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ ดังนั้นเอนไซม์จึงถูกนำมาใช้เคลือบกลับสู่ธรรมชาติได้ง่าย (Gennari *et al.*, 1998) เอนไซม์ไลเปสมีลักษณะเฉพาะที่สามารถทำปฏิกิริยาระหว่างโมเลกุลน้ำและน้ำมันด้วยลักษณะทาง

เคมีของเอนไซม์ไลเปสที่พิเศษนี้จึงได้ถูกนำมาใช้สำหรับการแก้ปัญหาของสารประกอบ chiral การปรับเปลี่ยนโครงสร้างของไขมันการสังเคราะห์ เป็นต้น ดังนั้นเอนไซม์ไลเปสนี้จึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับอุตสาหกรรม ได้แก่ อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมน้ำมันและไขมัน อุตสาหกรรมผงซักฟอก อุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษ อุตสาหกรรมเครื่องหนัง อุตสาหกรรมสิ่งทอในการสังเคราะห์สารอินทรีย์ การผลิตเครื่องสำอาง และการผลิตไบโอดีเซล เป็นต้น (Andualema and Gessesse, 2012)

4.5 การเพิ่มปริมาณชิ้นยีน 16S rRNA gene ด้วยเทคนิค PCR และการศึกษาแผนภูมิลำดับวิวัฒนาการของแบคทีเรีย

จากการศึกษาการเพิ่มปริมาณชิ้นยีนดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส อะไมเลส โปรตีเอส และไลเปส ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดบริสุทธิ์เป็นดีเอ็นเอต้นแบบและใช้ไพรเมอร์สากล (Wang *et al.*, 1996) แยกขนาดดีเอ็นเอผ่านเทคนิค agarose gel electrophoresis PCR Product เป็นเวลา 45 นาที (ภาพที่ 24)



ภาพที่ 24 แแถบดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียโดยเทคนิค agarose gel electrophoresis PCR product ที่มีขนาด 1,500 bp และ M คือ แแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder

โดยทั่วไปการระบุจำแนกชนิดสายพันธุ์ของแบคทีเรียมักอาศัยวิธีการสกัดเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์จาก PCR product และนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อเปรียบเทียบหาความเหมือนหรือคล้ายคลึง (% Identity) กับแบคทีเรียชนิดอื่นในฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม BLASTN (Basic Local Alignment Search Tools) จากฐานข้อมูล NCBI (Altschul *et al.*, 1990) ผลการวิจัยพบว่าเชื้อที่มีกิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดอันดับแรกของเอนไซม์ไฮโดรไลติก ได้แก่ เอนไซม์เซลลูเลส อะไมเลส โปรตีเอส และไลเปส สามารถระบุสายพันธุ์ดังสรุปในตารางที่ 12 และเมื่อศึกษาความสัมพันธ์ของลำดับวิวัฒนาการของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลติกจากการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดินในพื้นที่ป่านาสินวน อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม โดยการสร้างแผนภูมิลำดับวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม MEGA 7.0 ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลติกที่คัดเลือกได้ส่วนใหญ่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกับแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* (ภาพที่ 25-28) ซึ่งถือเป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทต่อการผลิตเชิงอุตสาหกรรมมากที่สุด

เทคนิค 16S rRNA เป็นเครื่องมือสำคัญในการจำแนกสายพันธุ์สิ่งมีชีวิตเนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงน้อยและมีบริเวณอนุรักษ์สูง อย่างไรก็ตามยังคงมีโอกาสที่จะพบข้อบกพร่องระหว่างแผนภูมิลำดับวิวัฒนาการโดยใช้ยีน 16S rRNA เมื่อเทียบกับการใช้เทคนิคอื่นๆ (Eisen, 2011) โดยทั่วไปเมื่อเปรียบเทียบลำดับวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตจากยีนต่างๆ จะพบความหลายของยีนสิ่งมีชีวิตแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับบรรพบุรุษของสิ่งมีชีวิตเหล่านั้น

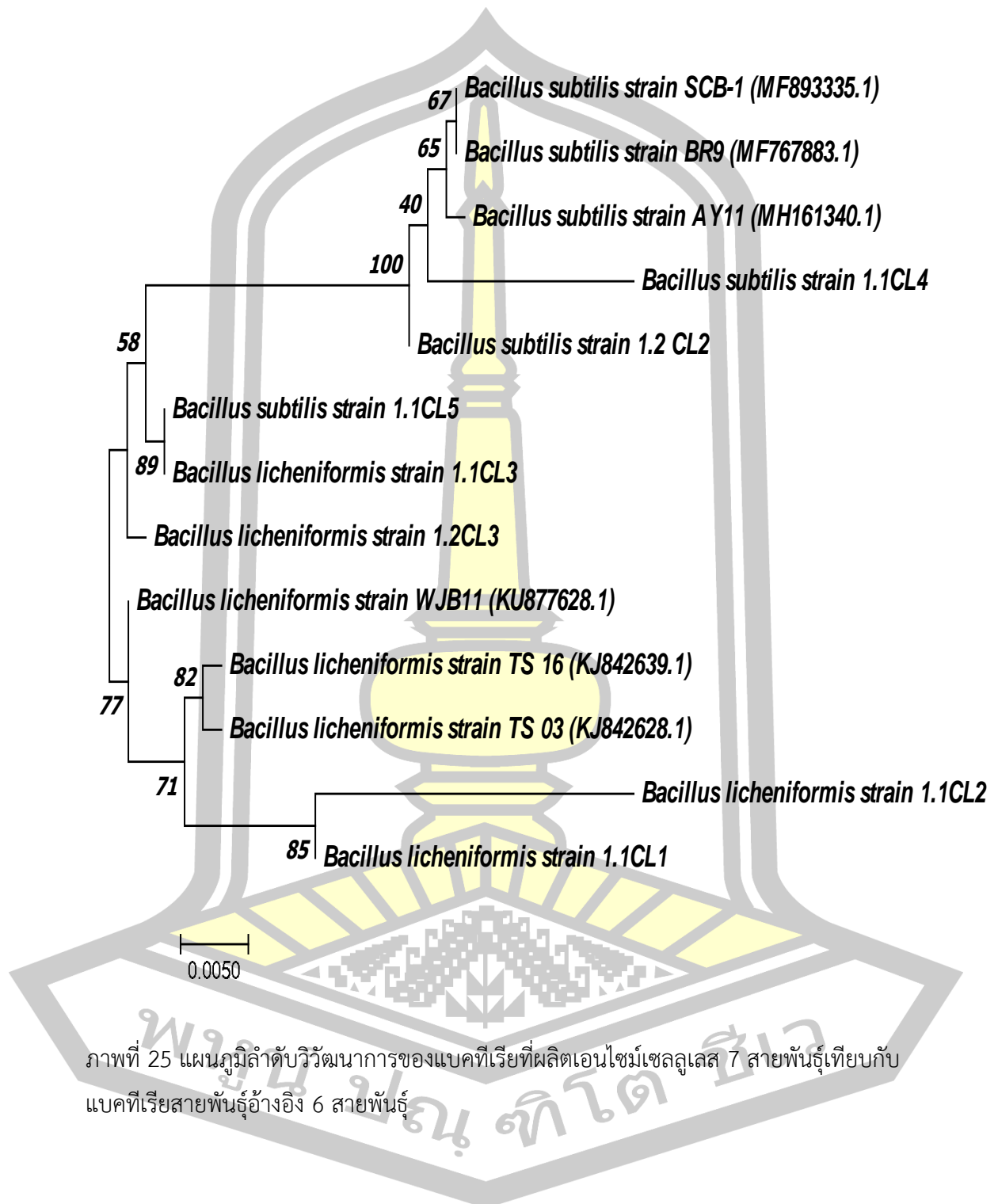
แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* บางชนิด ได้แก่ *B. subtilis* และ *B. licheniformis* ซึ่งจัดอยู่ใน GRAS ขององค์การอาหารและยา ถือว่ามีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคและเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์หลักในการนำไปใช้ในการผลิตเชิงอุตสาหกรรม ปัจจุบันกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพมีบทบาทสำคัญในการผลิตเอนไซม์ด้วยเทคนิคการตัดแต่งพันธุกรรมสิ่งมีชีวิตเพื่อเหนี่ยวนำให้สิ่งมีชีวิตผลิตเอนไซม์ในปริมาณมาก ซึ่งแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในชั้นบนของดินและเป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการหลั่งเอนไซม์ต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมได้หลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งขั้นตอนการผลิตโปรตีนจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* *Bacillus amyloliquefaciens* และ *Bacillus licheniformis* ที่ได้รับความนิยมมากที่สุดเนื่องจากสามารถให้ปริมาณผลผลิตที่สูงถึง 20-25 กรัม/ลิตร และผลิตสารพิษน้อยเมื่ออยู่ในกระบวนการหมัก (Dijl and Hecker, 2013)

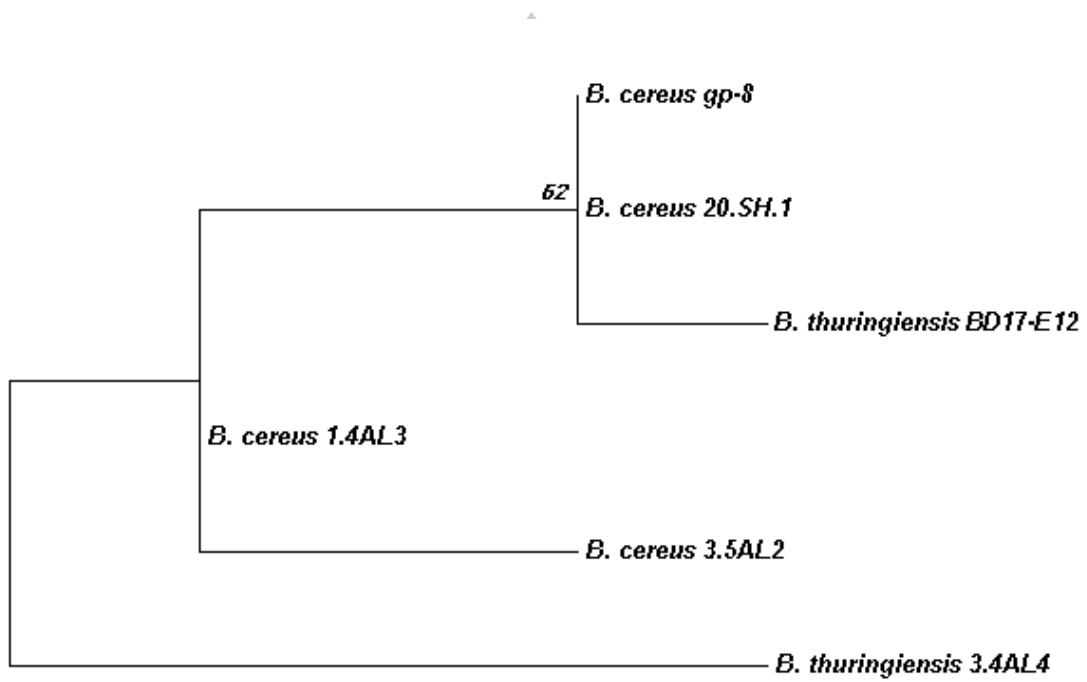
งานวิจัยนี้เป็นรายงานครั้งแรกที่คัดแยกแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลติกจากพื้นที่ป่าสาธารณะนาสินวน จังหวัดมหาสารคาม ซึ่งแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* มักมีบทบาทต่อการผลิตในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ที่มีราคาถูกและแบ่งจำนวนเซลล์ได้อย่างรวดเร็วในระยะเวลากำกัด อีกทั้งยังสามารถประยุกต์ใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาสร้างมูลค่าเพิ่มและสามารถนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการหมักเพื่อย่อยน้ำให้แบคทีเรียผลิตเอนไซม์ได้ตามที่เรียกขานนี้สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มีความสำคัญในการคัดเลือกเบื้องต้นต่อการหมักเพื่อย่อยน้ำให้เกิดการผลิตเอนไซม์รวมถึงปัจจัยขึ้นพื้นฐานของการเพาะเลี้ยง ได้แก่ อุณหภูมิ ความเข้มข้นของสารตั้งต้น และการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ เป็นต้น

ตารางที่ 17 สภาวะที่เหมาะสมของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลติก

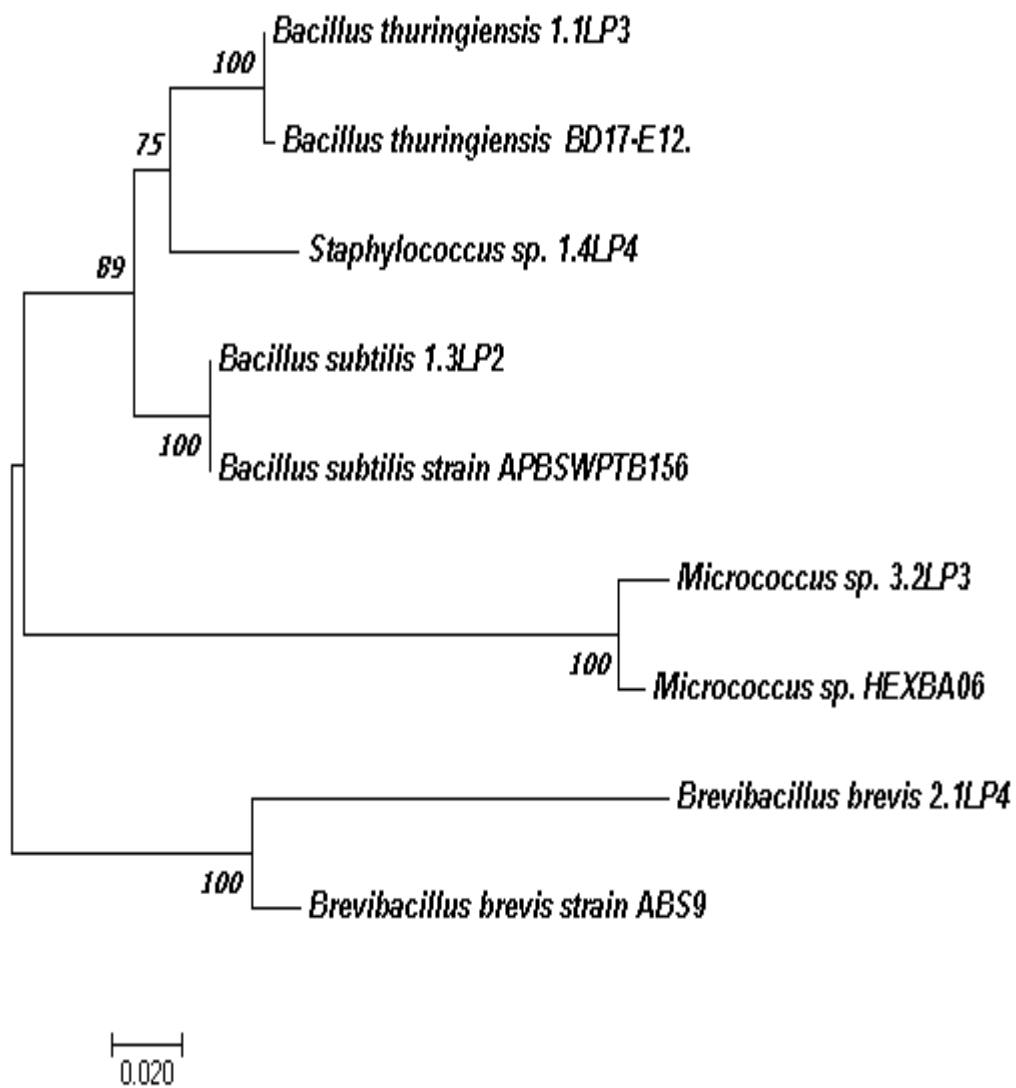
เอนไซม์	สปีชีส์	กิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิต/มิลลิลิตร, ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)	กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (ยูนิต/มิลลิลิตร*มิลลิเมตร, ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)	สภาวะที่เหมาะสม	
				pH	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)
เซลลูเลส	<i>Bacillus subtilis</i> 1.2CL2	5.54 \pm 0.00	5.94 \pm 0.25	6	35
อะไมเลส	<i>Bacillus cereus</i> 3.5AL3	47.15 \pm 0.82	0.77 \pm 0.02	7	65
โปรตีนเอส	<i>Bacillus subtilis</i> 2.3PT3	8.86 \pm 0.26	0.12 \pm 0.00	8	65
ไลเปส	<i>Bacillus subtilis</i> 1.3LP2	160.92 \pm 0.91	62.34 \pm 1.09	7	55





ภาพที่ 26 แผนภูมิลำดับวิวัฒนาการของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส 3 สายพันธุ์เทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิง 3 สายพันธุ์





ภาพที่ 28 แผนภูมิลำดับวิวัฒนาการของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส 5 สายพันธุ์เทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิง 4 สายพันธุ์



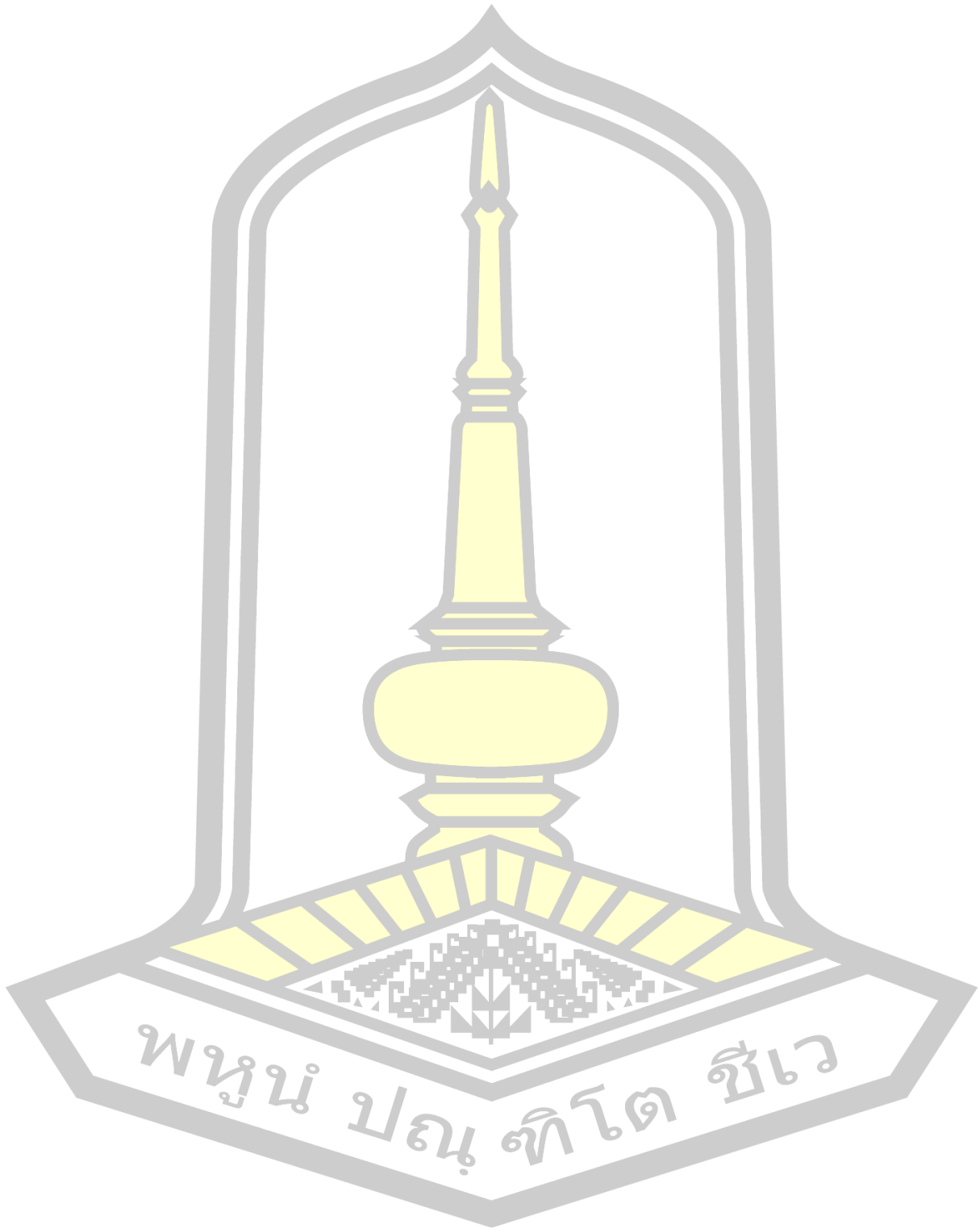
บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

ผลการศึกษาการคัดเลือกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลติกที่แยกจากดินในป่านาสีนวน จังหวัดมหาสารคาม ประเทศไทย การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรไลติกเอนไซม์บนอาหารแข็งจำเพาะบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งสังเกตจากบริเวณวงใสรอบๆ โคลนินี่ที่จะมีค่า Halo : colony ratios เป็นเกณฑ์ในการบ่งชี้ถึงความสามารถในการผลิตเอนไซม์ชนิดต่างๆ ซึ่งผลการทดลองพบว่ามีทั้งหมด 115 ไอโซเลท โดยแบ่งตามความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส อะไมเลส โปรตีเอส และไลเปส คือ 7 32 41 และ 35 ไอโซเลท ตามลำดับ ผลวิจัยพบแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลติกสูงสุดอันดับแรกจากสามอันดับของเอนไซม์ไฮโดรไลติกทั้งสี่ชนิดในอาหารเหลวที่มีสารตั้งต้นเข้มข้น 1% ดังนี้ (1) *Bacillus subtilis* 1.2CL2 มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุดเท่ากับ 5.54 ± 0.00 ยูนิท/มิลลิลิตร หลังบ่มในสภาวะที่เหมาะสมอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส pH 6 นาน 30 นาที (2) *Bacillus cereus* 3.5AL3 มีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูงที่สุดเท่ากับ 47.15 ± 0.82 ยูนิท/มิลลิลิตร หลังบ่มในสภาวะที่เหมาะสมอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส pH 7 นาน 30 นาที (3) *Bacillus subtilis* 2.3PT3 มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสสูงที่สุดเท่ากับ 8.86 ± 0.26 ยูนิท/มิลลิลิตร หลังบ่มในสภาวะที่เหมาะสมอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส pH 8 นาน 30 นาที และ(4) *Bacillus subtilis* 1.3LP2 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุดเท่ากับ 160.92 ± 0.91 ยูนิท/มิลลิลิตร หลังบ่มในสภาวะที่เหมาะสมอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส pH 7 นาน 30 นาที ตามลำดับ ซึ่งแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในงานวิจัยนี้ส่วนใหญ่คือแบคทีเรียสกุล *Bacillus* spp. ที่มีบทบาทสำคัญต่ออุตสาหกรรมเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ ผลิตภัณฑ์จากโคนม สิ่งทอและกระดาษ

งานวิจัยนี้เป็นการรายงานครั้งแรกที่คัดเลือกแบคทีเรียสกุล *Bacillus* sp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลติก (เซลลูเลส อะไมเลส โปรตีเอส และไลเปส) เอนไซม์จากแบคทีเรียเหล่านี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในทางอุตสาหกรรมต่างๆ ได้แก่ อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม สิ่งทอ การบำบัดน้ำเสีย การผลิตไบโอดีเซล ผลิตภัณฑ์นม เป็นต้น และสามารถเพิ่มมูลค่าการผลิตภายในประเทศไทยได้

บรรณานุกรม



บรรณานุกรม

- กรมทรัพยากรธรณี (2552). การจำแนกเขตเพื่อการจัดการด้านธรณีวิทยาและทรัพยากรธรณี จังหวัดมหาสารคาม. สืบค้นเมื่อ 25 พฤษภาคม 2560. จาก <http://www.dmr.go.th/download/digest/Mahasarakam>
- Acharya, S. and Chaudhary, A. (2012). Optimization of fermentation conditions for cellulases production by *Bacillus licheniformis* MVS1 and *Bacillus* sp. MVS3 isolated from Indian hot spring. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55(4), 497–503.
- Adrio, J. L. and Demain, A. L. (2014). Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomolecules*, 4(1), 117-139.
- Aislabie, J., Deslippe, J. R., and Dymond, J. R. (2013). Soil microbes and their contribution to soil services. *Ecosystem Services in New Zealand - Conditions and Trends*, 143–161.
- Aita, C., Giacomini, S. J. and Hübner, A. P. (2007). Nitrificação do nitrogênio amoniacal de dejetos líquidos de suínos em solo sob sistema de plantio direto. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 42(1), 95–102.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410.
- Andualema, B. and Gessesse, A. (2012). Microbial Lipases and their industrial applications. *Biotechnology*, 11(3), 100–118.
- Anwar, A. and Saleemuddin, M. (1998). Alkaline proteases: a review. *Bioresource Technology*, 64(3), 175–183.
- Apun, K., Jong, B. C. and Salleh, M. A. (2000). Screening and isolation of a cellulolytic and amylolytic *Bacillus* from sago pith waste. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 46(5), 263–267.
- Arikan, B. (2008). Highly thermostable, thermophilic, alkaline, SDS and chelator resistant amylase from a thermophilic *Bacillus* sp. isolate A3-15. *Bioresource Technology*, 99(8), 3071–3076.

- Asgher, M., Javaid Asad, M., Rahman, S.U. and Legge, R.L. (2007). A thermostable α -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. *Journal of Food Engineering*, 79, 950-955.
- Ashwini, K., Gaurav, K., Karthik, L. and Bhaskara, Rao, K. V. (2011). Optimization, production and partial purification of extracellular α - amylase from *Bacillus sp. marini*. *Archives of Applied Science Research*, 3(1), 33-42.
- Bagewadi, Z. K., Garg, S. D., Deshnur, P. B., Shetti, N. S. and Banne, A. A. (2011). Production dynamics of extracellular alkaline protease from *Neisseria* spp. isolated from soil. *Society for Applied Biotechnology*, 1(4), 483-493.
- Boominadhan, U., Rajakumar, R., Karpaga, P., Sivakumaar, V. and Joe, M. M. (2009). Optimization of protease enzyme production using *Bacillus* sp. isolated from different wastes. *Botany Research International*, 2(2), 83-87.
- Boonmahome, P. (2013). Lipase-producing bacterium and its enzyme characterization. *Journal of Life Sciences and Technologies*, 1(4), 196-200.
- Conklin, J.R. (2002). Soil microorganisms. *Soil Sediment and Water*, 1-4.
- Cupp-enyard, C. (2008). Sigma ' s non-specific protease activity assay - casein as a substrate. *Journal of Visualized Experiments*, (19), 2-4.
- Dawson, T. E. and Ehleringer, J. R. (1993). Isotopic enrichment of water in the "woody" tissues of plants: Implications for plant water source, water uptake, and other studies which use the stable isotopic composition of cellulose. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 57(14), 3487-3492.
- Dijl, J. M. V. and Hecker, M. (2013). *Bacillus subtilis* : from soil bacterium to super-secreting cell factory. *Microbial Cell Factories*, 1-6.
- Djekrif-Dakhmouche, S., Gheribi-Aoulmi, Z., Meraihi, Z. and Bennamoun, L. (2006). Application of a statistical design to the optimization of culture medium for α -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. *Journal of Food Engineering*, 73(2), 190-197.

- Dorcas, K., Roy, V. V. (2012). Screening and identification of protease producing bacteria from soil. *Association for the Advancement of Biodiversity Science*, 1(2), 246–248.
- Eisen, J. A. (2011). rRNAs from the same species. *Journal of Molecular Evolution*, 1995(6), 1105–1123.
- Ertuğrul, S., Dönmez, G. and Takaç, S. (2007). Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. *Journal of Hazardous Materials*, 149(3), 720–724.
- Fatima, H. and Khan, N. (2015). Production and partial characterization of lipase from *Pseudomonas putida*. *Fermentation Technology*, 4(1).
- Femi-Ola, T. O., Odeyemi, A. T., Olaiya, B. S. and Ojo, O. O. (2018). Characterization of lipase from *Bacillus subtilis* isolated from oil contaminated soil. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 6(1), 10–17.
- Franklin, R. Cockerill III, Wikler, M.A., Alder, J., Dudley, M.N., Eliopoulos, G.M., Ferraro, M.J., Hardy, D.J., Hecht, D.W., Hindler, J.A., Patel, J.B., Powell, M., Swenson, J.M., Thomson, R.B., Traczewski, M.M., Turnidge, J.D., Weinstein, M.P. and Zimme, B. L. (2012). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically ; Approved Standard — Ninth Edition. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 32(2),
- Gebreselema, G. (2015). Isolation and optimization of amylase producing bacteria and actinomycetes from soil samples of Maraki and Tewedros campus, University of Gondar, North West Ethiopia. *African Journal of Microbiology Research*, 9(31), 1877–1882.
- Gennari, F., Miertus, S., Stredansky, M. and Pizzio, F. (1998). Use of biocatalysts for industrial applications. *Genetic Engineering Biotechnology*, 4, 14-23.
- Ghose, T. K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, 59(2).
- Goyal, N., Gupta, J. K. and Soni, S. K. (2005). A novel raw starch digesting thermostable α -amylase from *Bacillus* sp. I-3 and its use in the direct

- hydrolysis of raw potato starch. *Enzyme and Microbial Technology*, 37(7), 723–734.
- Gupta, R., Gupta, N. and Rathi, P. (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(6), 763–781.
- Haq, I. U., Ashraf, H., Iqbal, J. and Qadeer, M. A. (2003). Production of alpha amylase by *Bacillus licheniformis* using an economical medium. *Bioresource Technology*, 87(1), 57–61.
- Harshvardhan, K., Mishra, A. and Jha, B. (2013). Purification and characterization of cellulase from a marine *Bacillus* sp. H1666: A potential agent for single step saccharification of seaweed biomass. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 93, 51–56.
- Hasan, F. and Hameed, A. (2001). Optimization of Lipase Production from *Bacillus* sp. *Pakistan Journal of Botany*, 33, 789–796.
- Hasan, F., Shah, A. A. and Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(2), 235–251.
- Hassan, S. W. M., Hassan, S.W.M., Latif, H.Abd E.L. and Safaa, M.A. (2018). Production of cold-active lipase by free and immobilized marine *Bacillus cereus* HSS : application in wastewater treatment, 9, 1–13.
- Head, I.M., Saunders, J.R. and Pickup, R.W. (1998). Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial Ecology*, 35(1), 1–21.
- Heck, J. X., Hertz, P. F. and Ayub, M. A. Z. (2002). Cellulase and xylanase production by isolated amazon *Bacillus* strains using soybean industrial residue based solid-state cultivation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33(3), 213–218.
- Hoorman, J. J. (2011). The Role of Soil Bacteria. *The Ohio State University Extension*, 1–4.
- Howard, R. L., Abotsi, E., Jansen, Van R. E. L. and Howard, S. (2003). Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology*, 2(12), 602–619.

- Jaeger, K. and Reetz, M.T. (1998). Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 16(9), 396–403.
- Janda, J.M. and Abbott, S.L. (2007). Minireview 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), 2761–2764.
- Kandra, L. (2003). α -Amylases of medical and industrial importance. *Journal of Molecular Structure: theochem*, 487–498.
- Karmarkar, M. and Ray, R.R. (2011). Current trends in research and application of microbial cellulases. *Research Journal of Microbiology*, 6(1), 41–53.
- Kirk, O., Borchert, T. V. and Fuglsang, C. C. (2002). Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4), 345–351.
- Kumar Vinay, P.G. and Ramalingappa, B. (2018). Molecular characterization of extracellular lipase producing soil bacteria, *Bacillus* sp. RV 12 and *Bacillus* sp. RV 18 and optimization for process parameters. *International Journal of Advanced Life Sciences*, 11(3), 86-91.
- Lawson, L. D. and Hughes, B. G. (1988). Human absorption of fish oil fatty acids as triacylglycerols, free acids, or ethyl esters. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 152(1), 328–335.
- Liang, Y.L., Zhang, Z., Wu, M., Wu, Y. and Feng, J. X. (2014). Isolation, screening, and identification of cellulolytic bacteria from Natural Reserves in the Subtropical Region of China and optimization of cellulase production by *Paenibacillus terrae* ME27-1. *BioMed Research International*, 1–13.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, L. and Randall, R.J. (1951). The folin by oliver. *The Journal of Biotechnological Chemistry*, 193(1), 265–275.
- Machida, M., Asai, K., Sano, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Terai, G. and Kikuchi, H. (2005). Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature Biotechnology*, 438(7071), 1157–1161.
- Maki, M. L., Idrees, A., Leung, K. T. and Qin, W. (2012). Newly isolated and characterized bacteria with great application potential for decomposition of

- lignocellulosic biomass. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 22(3), 156–166.
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P. and Foster, G. D. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(6), 614–629.
- Markossian, S., Becker, P. and Märkl, H. (2000). Isolation and characterization of lipid-degrading *Bacillus thermoleovorans* IHI-91 from an icelandic hot spring, 365–366.
- Miller, G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.
- Minussi, R. C., Pastore, G. M. and Durán, N. (2002). Potential applications of laccase in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 13(6), 205–216.
- Mishra, S. and Behera, N. (2008). Amylase activity of a starch degrading bacteria isolated from soil receiving kitchen wastes. *African Journal of Biotechnology*, 7(18), 3326-3331.
- Mojsov K. (2012). Microbial α -amylase and their industrial applications: A review. *International Journal of Management, IT and Engineering*, 2(10), 583–609.
- Moreno, N., García C. and Hernández, T. (2013). Toxic effect of cadmium and nickel on soil enzymes and the influence of adding sewage sludge. *European Journal of Soil Science*, 54(2), 377–386.
- Nadaft, R.D. and Shivasharanna, C.T. (2019). Extracellular lipase from *Bacillus subtilis* KUB4: isolation, identification and characterization. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 10(5), 2545–2549.
- Naidu, M. A. (2013). Bacterial amylase a review. *International Journal of Pharmaceutical and Biological Archive*, 4(2), 274–287.
- Naresh, S., Kunasundari, B., Anas, A., Gunny, N. and Peng, Y. (2019). Isolation and partial characterisation of thermophilic cellulolytic bacteria from north malaysian tropical mangrove soil. *Tropical Life Science Research*, 30(1), 123–147.
- Nargotra, P., Vaid, S. and Bajaj, B. K. (2016). Cellulase Production from *Bacillus subtilis* SV1 and Its application potential for saccharification of ionic liquid pretreated

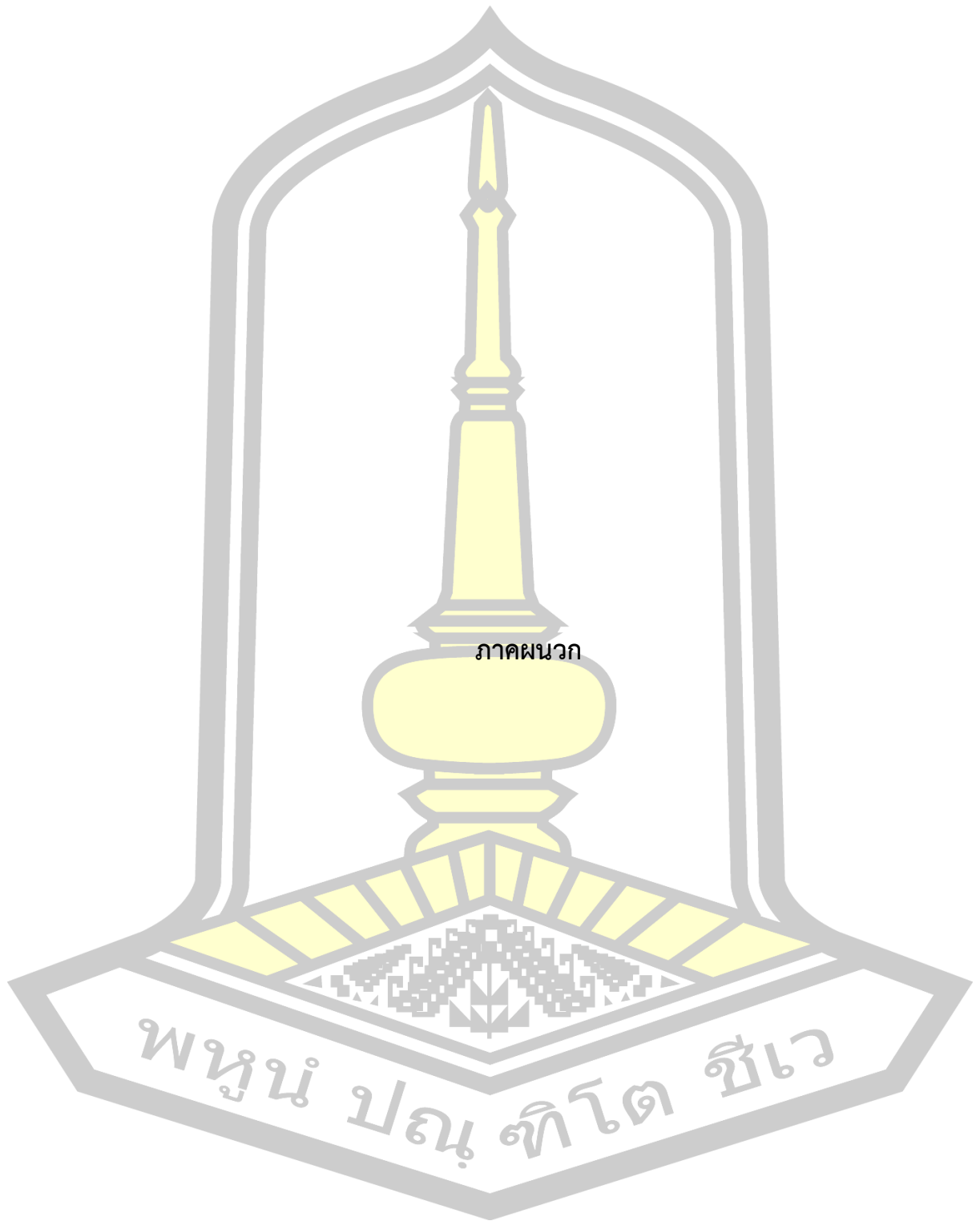
- pine needle biomass under one pot consolidated bioprocess, *Fermentation: MDPI*, 2(9), 1–16.
- Nkohla, A., Okaiyeto, K., Olaniran, A., Nwodo, U., Mabinya, L. and Okoh, A. (2017). Optimization of growth parameters for cellulase and xylanase production by *Bacillus* species isolated from decaying biomass. *Journal of Biotech Research*, 8, 33– 47.
- Nwanyanwu, C.E., Umeh, S.I. and Sapele, A. (2015). Effect of phosphate solubilizing bacteria on. *Nigerian Journal of Microbiology*, 29, 3159–3166.
- Padhiar, A. R. and Kommu, S. (2016). Isolation, characterization and optimization of bacteria producing amylase. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, 3(7), 69–75.
- Palsaniya, P., Mishra, R., Beejawat, N., Sethi, S. and Gupta, B.L. (2012). Optimization of alkaline protease production from bacteria isolated from soil. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 2(6), 858–865.
- Pant, G.V., Prakash, A., Pavani, J.V.P., Bera, S., Deviram, G.V.N.S, Kumar, A., Panchpuri, M. and Prasuna, R.G. (2015). Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. *Integrative Medicine Research*, 9(1), 50–55.
- Phitsuwan, P., Laohakunjit, N., Kerdchoechuen, O., Kyu, K. L. and Ratanakhanokchai, K. (2013). Present and potential applications of cellulases in agriculture, biotechnology, and bioenergy. *Folia Microbiologica*, 58(2), 163–176.
- Praveen, D. and Sharmishtha, P. (2017). Isolation and screening of cellulolytic bacteria from soil and optimization of cellulase production, 5(2), 277–282.
- Radhakrishnan, R. and Baek, K. H. (2017). Physiological and biochemical perspectives of non-salt tolerant plants during bacterial interaction against soil salinity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 116, 116–126.
- Rani, G., Rathi, P. and Bradoo, S. (2003). Lipase mediated upgradation of dietary fats and oils. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(6), 635–644.
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S. and Deshpande, V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 597–635.

- Robyt, J. F. (2008). Starch: structure, properties, chemistry, and enzymology. (Fraser-Reid, B. O., Tatsuta, K. and Thiem, J., Eds.), Glycoscience: Chemistry and Chemical Biology. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Sadhu, S. and Maiti, T. K. (2013). Cellulase production by bacteria : a review. *British Microbiology Research Journal*, 3(3), 235–258.
- Sarrouh, B., Santos, T.M., Miyoshi, A., Dias, R. and Azevedo, V. (2012). Up-to-date insight on industrial enzymes applications and global market. *Journal of Bioprocessing and Biotechniques*, 1–10.
- Saxena, R., Sheoran, A., Giri, B. and Davidson, W. S. (2003). Purification strategies for microbial lipases. *Journal of Microbiological Methods*, 52(1), 1–18.
- Seitz, E. W. (1974). Industrial application of microbial lipases: a review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 51(2), 12–16.
- Sethi, S., Datta, A., Gupta, B. L. and Gupta, S. (2013). Optimization of cellulase production from bacteria Isolated from soil. *International Scholarly Research Notices of Biotechnology*, 2013, 1-7.
- Shaikh, N. M., Pantel, A. A., Mehta, S. A. and Pantel, N. D. (2013). Isolation and Screening of cellulolytic bacteria inhabiting different environment and optimization of cellulase production. *Universal Journal of Environmental Research and Technology*, 3(1), 39–49.
- Shanmugapriya, K., Saravana, P. S. and Manoharan, M. (2012). Isolation , screening and partial purification of cellulase from cellulase producing bacteria. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research ISSN*, 3(1), 509–514.
- Sirisha, E., Rajasekar, N. and Narasu, M. L. (2010). Isolation and optimization of lipase producing bacteria from oil contaminated soils. *Advance in Biological Research*, 4(5), 249–252.
- Stefan, G., Basten, S. L., Freddy, C.T.H., Henk, D., Olga, K., Janneke, B., Janneke, B., Henk, M., Casper, W.Q., Johannes, A.H. and Wim, H.V.D. (2018). Integrating quantitative morphological and qualitative molecular methods to analyze soil nematode community responses to plant range expansion. *Methods in Ecology and Evolution*, 1-13.

- Suganthi, C., Mageswari, A., Karthikeyan, S., Anbalagan, M., Sivakumar, A. and Gothandam, K. M. (2013). Screening and optimization of protease production from a halotolerant *Bacillus licheniformis* isolated from saltern sediments. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 11(1), 47–52.
- Sujatha, K. and Dhandayuthapani, K. (2013). Optimization of lipase production media parameters by a newly isolated *Bacillus licheniformis* KDP from oil mill soil. *International Journal of Pharma and Bio Sciences ISSN*, 4(2), 645–652.
- Sundarram, A. and Murthy, T. P. K. (2014). α -Amylase production and applications : a Review. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 2(4), 166–175.
- Sztajer, H., Maliszewska, I. and Wieczorek, J. (1988). Production of exogenous lipases by bacteria, fungi, and actinomycetes. *Enzyme and Microbial Technology*, 10(8), 492–497.
- Tamura, K. and Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10(3), 512–526.
- Tanyildizi, M. S., Özer, D. and Elibol, M. (2005). Optimization of α -amylase production by *Bacillus* sp. using response surface methodology. *Process Biochemistry*, 40(7), 2291–2296.
- Trevors, J. T. (1998). Bacterial biodiversity in soil with an emphasis on chemically-contaminated soils. *Water, Air, and Soil Pollution*, 101(1–4), 45–67.
- Tyc, O., Song, C., Dickschat, J. S., Vos, M. and Garbeva, P. (2017). The ecological role of volatile and soluble secondary metabolites produced by soil bacteria. *Trends in Microbiology*, 25(4), 280–292.
- US Salinity Laboratory Staff (1954). Diagnosis and improvement of saline and alkali soils. USDA Agricultural Handbook No. 60. U.S. Government Printing Office. Washington, DC.
- Vaidya, S. and Rathore, P. (2015). Isolation, screening and characterization of amylase producing bacteria from soil of potato dump sites from different regions of madhya Pradesh. *Life Science International research journal*, 1-7.

- Veerapagu, M., Sankara Narayanan, A., Ponmurugan, K. and Jeya, K. R. (2013). Screening selection identification production and optimization of bacterial Lipase from oil spilled soil. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 6(3), 62–67.
- Verma, V., Avasthi, S., Gupta, A. R., Singh, M. and Kushwaha, A. (2011). Amylase production and purification from bacteria isolated from a Waste Potato Dumpsite in District Farrukhabad U.P State India. *European Journal of Experimental Biology*, 1(3), 107–113.
- Wang, R., Cao, W. and Cerniglia, C. E. (1996). PCR detection and quantitation of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(4), 1242–1247.
- Watanabe, H. and Tokuda, G. (2010). Cellulolytic systems in insects. *Annual Review of Entomology*, 55(1), 609–632.
- Winkler, M. and Stuckmann, M. (1979). Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*, 138(3), 663–670.
- Wood, T. M. and McCrae, S. I. (1986). The cellulase of *Penicillium pinophilum*. synergism between enzyme components in solubilizing cellulose with special reference to the involvement of two immunologically distinct cellobiohydrolases. *The Biochemical Journal*, 234, 93–99.
- Zanphorlin, L. M., Cabral, H., Arantes, E., Assis, D., Juliano, L., Juliano, M. A., Da-silva, R., Gomes, E. and Bonilla-rodriguez, G. O. (2011). Purification and characterization of a new alkaline serine protease from the thermophilic fungus *Myceliophthora* sp . *Process Biochemistry*, 46(11), 2137–2143.

พหุ ประถมศึกษา



ภาคผนวก

พหุบัน ปณฺ ทิโต ชีเว

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. สูตรอาหารแข็งคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (Carboxymethyl cellulose agar) (กรัม/100 มิลลิลิตร)

CMC	1.0
NaNO ₃	0.1
KCl	0.1
MgSO ₄	0.05
Yeast extract	0.05
Glucose	0.1
Agar	1.5

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นและปรับค่า pH ของอาหารแข็งให้ได้ pH 7.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. สูตรอาหารเหลวคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (Carboxymethyl cellulose liquid medium) (กรัม/ลิตร)

CMC	0.1
Glucose	0.5
Peptone	0.75
FeSO ₄	0.01
KH ₂ PO ₄	0.5
MgSO ₄	0.5

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นและปรับค่า pH ของอาหารเหลวให้ได้ pH 7.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. สูตรอาหารแข็ง starch agar (กรัม/ลิตร)

Beef extract	3.0
Starch soluble	10.0
Agar	15.0

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นและปรับค่า pH ของอาหารแข็งให้ได้ pH 7.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. สูตรอาหารเหลว starch soluble (กรัม/ลิตร) (Bhaskara *et al.*, 2011)

Starch soluble	10.0
Peptone	10.0
Yeast extract	20.0
KH ₂ PO ₄	0.05
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.015
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.25
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.05
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นและปรับค่า pH ของอาหารเหลวให้ได้ pH 7.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. สูตรอาหารแข็ง skim milk (กรัม/100 มิลลิลิตร)

Tryptone	1.0
Peptone	0.5
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.3
K ₂ HPO ₄	2.0
MgSO ₄	0.2
Casein	1.0
Agar	1.5

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นและปรับค่า pH ของอาหารแข็งให้ได้ pH 7.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6. สูตรอาหารเหลว skim milk (กรัม/100 มิลลิลิตร)

Tryptone	1.0
Peptone	0.5
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.3
K ₂ HPO ₄	2.0
MgSO ₄	0.2
Casein	1.0

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นและปรับค่า pH ของอาหารเหลวให้ได้ pH 7.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

7. สูตรอาหารแข็ง tributyrin agar (กรัม/100 มิลลิลิตร)

Peptone	0.5
Yeast extract	0.3
Tributyrin	1.0
Agar	1.5

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นและปรับค่า pH ของอาหารแข็งให้ได้ pH 7.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

8. สูตรอาหารเหลว lipase production medium (กรัม/100 มิลลิลิตร)

Peptone	0.2
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.1
NaCl	0.25
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.04
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.04
Olive oil	1.0
Tween 80	2.0

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นและปรับค่า pH ของอาหารเหลวให้ได้ pH 7.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS method (Miller, 1959)

1.1 สารเคมี

ชั่ง 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) ปริมาณ 20 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายต่าง (ประกอบด้วย NaOH 32 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 350 มิลลิลิตร) ลงไปที่ละลาย ละลายให้เป็นสารละลายเดียวกัน จากนั้นนำไปอังในน้ำร้อนจนสารละลายมีความใส จากนั้นเติม K_2Na -tartrate ลงไปที่ละเล็กน้อยจนมีปริมาณครบ 600 กรัม ปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 200 มิลลิลิตร เก็บใส่ขวดสีชา ปิดฝาให้มิดชิดพร้อมปิดฉลากระบุชื่อสารและเก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง

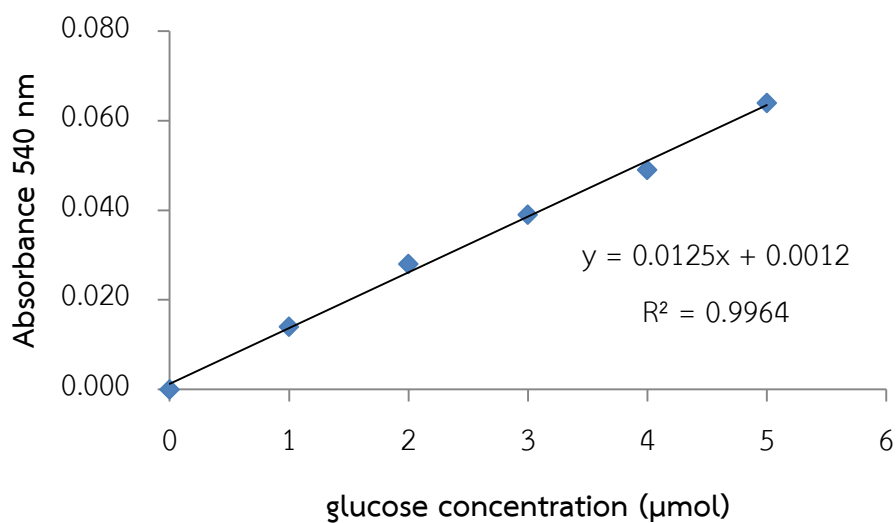
1.2 วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานน้ำตาลรีดิวซ์

เตรียมสารละลายกลูโคสที่มีความเข้มข้น 0 1 2 3 4 และ 5 ไมโครโมลาร์/มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายกลูโคสปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย DNS ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงสู่หลอดทดลอง นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปแช่ในน้ำเย็นเป็นเวลา 10 นาที เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร (ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ) บันทึกผลจากและนำไปสร้างกราฟมาตรฐานกลูโคสเพื่อเทียบหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในตัวอย่าง

การเตรียมสารละลาย blank ปิเปตน้ำกลั่นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย DNS ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร สู่หลอดทดลอง จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปแช่ในน้ำเย็นเป็นเวลา 10 นาที เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร สำหรับปรับค่าดูดกลืนแสงให้ได้ 0.000 (ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ) บันทึกผลจากและนำไปสร้างกราฟมาตรฐานกลูโคสเพื่อเทียบหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในตัวอย่าง

1.3 การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในตัวอย่าง

ปิเปตตัวอย่างปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย DNS ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงสู่หลอดทดลอง จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปแช่ในน้ำเย็นเป็นเวลา 10 นาที เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร (ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ) บันทึกผลจากและนำไปสร้างกราฟมาตรฐานกลูโคสเพื่อเทียบหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในตัวอย่าง



กราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคส (ไมโครโมลาร์/มิลลิลิตร)

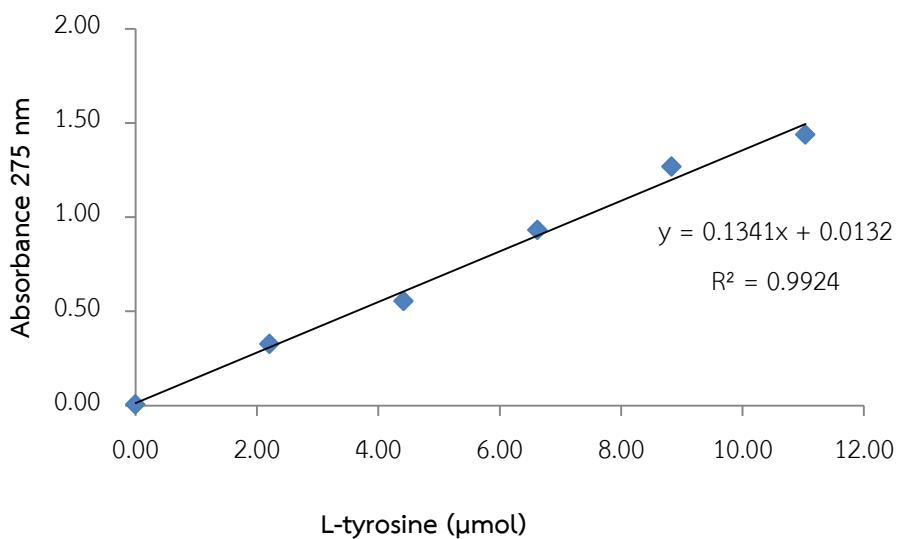
2. การเตรียมกราฟมาตรฐานไทโรซีน

2.1 ชั่งไทโรซีนปริมาณ 10 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลายไทโรซีนที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เก็บไว้เป็น stock solution

2.2 เจือจางสารละลายไทโรซีนให้ได้ความเข้มข้น 0 200 400 600 800 และ 1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

2.3 นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 275 นาโนเมตร บันทึกผลและนำไปสร้างกราฟมาตรฐานสารละลายไทโรซีน (ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ)

พหุ ประถมศึกษา ชีวะ



กราฟมาตรฐานไทโรซีน (ไมโครโมลาร์)

3. การเตรียมสารและวิธีวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (Winkler และ Stuckmann, 1975)

3.1 สารเคมีที่ใช้

- 1) *p*- nitrophenyl palmitate (*p*NPP)
- 2) Isopropanol
- 3) Sodium deoxycholate (Na-DOC)
- 4) Arabic gum
- 5) Hydrochloric acid (HCl)
- 6) Sodium hydroxide (NaOH)

3.2 การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตามวิธีของ Winkler และ Stuckmann (Winkler and Stuckmann, 1979)

3.2.1 สารละลาย A : ละลาย *p*- nitrophenyl palmitate (*p*NPP) ปริมาณ 30 มิลลิกรัม ละลายใน isopropanol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3.2.2 สารละลาย B : เตรียมสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (pH 8.0) ที่ผสม Sodium deoxycholate (Na-DOC) ปริมาณ 207 มิลลิกรัม กับ gum arabic ปริมาณ 100 มิลลิกรัม

3.2.3 สารละลาย C : ผสมสารละลาย A และ B ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 100 มิลลิลิตร เพื่อนำไปทดสอบหากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของตัวอย่างในขั้นตอนต่อไป

วิธีการตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดยดัดแปลงจากวิธีของ Winkler และ Stuckmann (Winkler and Stuckmann, 1979)

ปิเปต crude enzyme ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับสารตั้งต้น (สารละลาย C) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาตร 0.9 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงแยกด้วยความเร็ว 3,500 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำส่วนใสที่ได้มาเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร กำหนดให้เอนไซม์ไลเปสมีค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสงต่อโมลาร์ (molar extinction coefficient) เท่ากับ $15.0 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Winkler and Stuckmann, 1979) เทียบกับกราฟมาตรฐาน *p*-nitrophenol เพื่อหากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสและบันทึกผลการทดลอง (ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ)

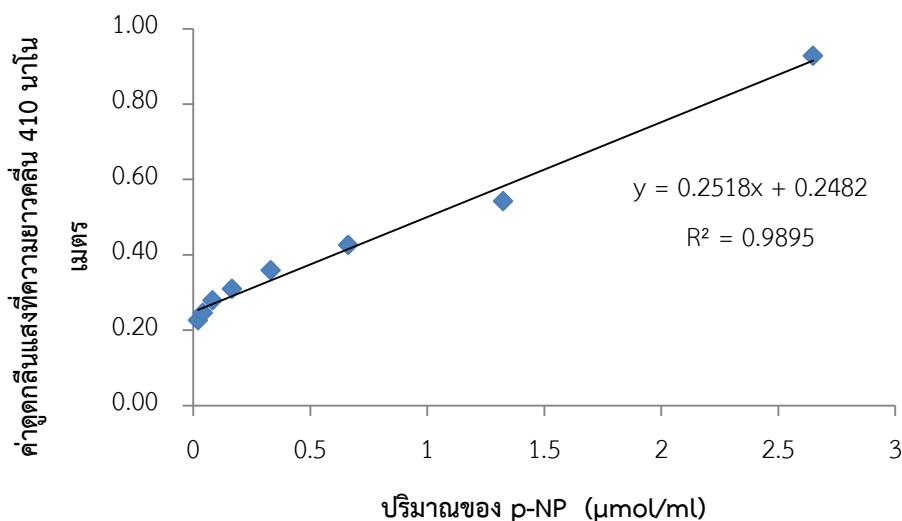
กำหนดให้ 1 ยูนิตของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ไลเปสที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารตั้งต้นได้ *p*NP จำนวน 1 ไมโครโมลาร์ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

3.3 การเตรียมกราฟมาตรฐาน *p*-nitrophenol (*p*NP)

3.3.1 ชั่งสารมาตรฐาน *p*NP ปริมาณ 10 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรโดยใช้ volumetric flask ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพื่อเตรียมเป็น stock standard solution (1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) เก็บในขวดสีชาพร้อมปิดฉลากระบุชื่อสาร ความเข้มข้นของสาร วันที่เตรียม ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ครั้งต่อไป

3.3.2 ปิเปต Stock solution ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นใน volumetric flask ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (working standard solution) จากนั้นเจือจางให้ได้สารละลาย *p*NP ให้มีความเข้มข้น 3.91 7.82 15.62 31.25 62.5 125 250 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ปิเปตสารละลาย *p*NP ที่เจือจางแล้วปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับสารตั้งต้น (สารละลาย C) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาตร 0.9 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงแยกด้วยความเร็ว 3,500 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำส่วนใสที่ได้มาเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร บันทึกผลการทดลองและนำไปสร้างกราฟมาตรฐาน *p*NP (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) โดยมีสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (pH 7.0) เป็น blank



กราฟมาตรฐาน p-NP (ไมโครโมลาร์/มิลลิลิตร)

4. การเตรียมกราฟมาตรฐานของโปรตีน

4.1 สารเคมีที่ใช้

4.1.1 สารละลาย A : 1% (w/v) คอปเปอร์ ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)

4.1.2 สารละลาย B : 2% (w/v) โซเดียม โปแทสเซียม ทาร์เตรต (Sodium potassium tartrate)

4.1.3 สารละลาย C : 0.2 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide)

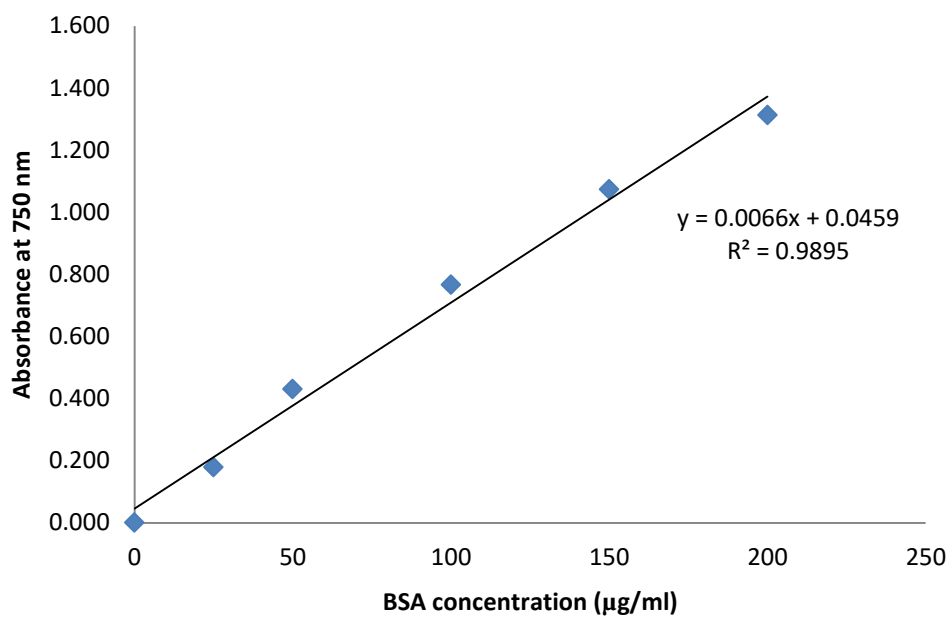
4.1.4 สารละลาย D : 4% (w/v) โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate)

4.1.5 Folin-Ciocalteu's phenol reagent

4.1.6 สารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์ (alkaline copper solution) เตรียมโดยผสมสารละลาย C ปริมาตร 49 มิลลิลิตร กับสารละลาย D ปริมาตร 49 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย A ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

เตรียมโบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine Serum Albumin, BSA) ให้ได้ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 25 50 100 150 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ นำสารละลายโปรตีนแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มาเติมสารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์ (alkaline copper solution) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลายโฟลิน-ฟินอล (Folin-Ciocalteu's phenol reagent) ที่ผ่านการเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 : 1 ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโน

เมตร โดยใช้ น้ำกลั่น เป็น blank นำค่าที่ได้มาพลอตกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตรกับความเข้มข้นของ BSA (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)



กราฟมาตรฐานโบวีนซีรัมอัลบูมิน (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)



ภาคผนวก ค

ข้อมูลวิเคราะห์ทางสถิติ

1. ค่า Halo : colony ratios ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลติกจำนวน 115 ไอโซเลท จากพื้นที่ป่ามาลีนวน ตำบลมาลีนวน อำเภอทับทิมศรีชัย จังหวัดมหาสารคาม

1.1 เอนไซม์เซลลูเลส

Isolates	Halo : colony ratios			Mean	SD
	R1	R2	R3		
1.1CL1	1.99	1.98	2.00	1.99	0.01
1.1CL2	2.00	1.95	2.05	2.00	0.05
1.1CL3	2.61	2.59	2.60	2.60	0.01
1.1CL4	2.20	2.21	2.18	2.20	0.02
1.1CL5	1.50	1.49	1.52	1.50	0.02
1.2CL2	1.20	1.19	1.22	1.20	0.02
1.2CL3	2.57	2.64	2.59	2.60	0.04

1.2 เอนไซม์อะไมเลส

Isolates	Halo : colony ratios			Mean	SD
	R1	R2	R3		
1.1AL1	1.63	1.65	1.70	1.66	0.03
1.1AL2	1.90	1.87	1.86	1.88	0.02
1.2AL3	1.63	1.54	1.58	1.58	0.03
1.3AL1	1.43	1.41	1.46	1.43	0.02
1.3AL2	1.65	1.68	1.69	1.67	0.02
1.4AL1	1.49	1.55	1.47	1.50	0.03
1.4AL2	1.65	1.57	1.58	1.60	0.03
1.4AL3	1.35	1.34	1.40	1.36	0.02
1.4AL15	1.05	1.11	1.15	1.10	0.04
2.1AL1	1.43	1.37	1.39	1.40	0.02
2.1AL2	1.15	1.12	1.18	1.15	0.02
2.2AL1	1.19	1.22	1.18	1.20	0.02
2.2AL2	1.42	1.46	1.44	1.44	0.01
2.3AL1	1.17	1.21	1.23	1.20	0.02
2.3AL2	1.51	1.61	1.56	1.56	0.03

1.2 เอนไซม์อะไมเลส (ต่อ)

Isolates	Halo : colony ratios			Mean	SD
	R1	R2	R3		
2.3AL7	1.49	1.46	1.54	1.50	0.03
2.3AL8	1.65	1.63	1.58	1.62	0.03
2.3AL9	1.50	1.47	1.39	1.45	0.04
2.3AL10	1.15	1.25	1.19	1.20	0.04
2.4AL1	1.28	1.24	1.22	1.25	0.02
2.4AL2	1.49	1.53	1.47	1.50	0.02
3.1AL1	1.89	1.92	1.89	1.90	0.01
3.2AL1	1.23	1.19	1.18	1.20	0.02
3.3AL1	1.74	1.78	1.74	1.75	0.02
3.4AL1	1.37	1.39	1.43	1.40	0.02
3.4AL2	1.43	1.42	1.44	1.43	0.01
3.4AL3	1.88	1.84	1.85	1.86	0.02
3.4AL4	2.49	2.51	2.49	2.50	0.01
3.5AL1	1.43	1.44	1.44	1.44	0.00
3.5AL2	1.44	1.42	1.44	1.43	0.01
3.5AL3	1.48	1.51	1.52	1.50	0.02

1.3 เอนไซม์โปรตีเอส

Isolates	Halo : colony ratios			Mean	SD
	R1	R2	R3		
1.1PT1	1.48	1.54	1.47	1.50	0.03
1.1PT2	1.57	1.56	1.49	1.54	0.03
1.1PT3	1.18	1.27	1.24	1.23	0.03
1.1PT7	1.63	1.59	1.63	1.62	0.02
1.1PT8	1.63	1.56	1.53	1.57	0.04
1.1PT9	1.36	1.43	1.45	1.41	0.04
1.1PT10	1.73	1.74	1.74	1.74	0.00
1.1PT11	1.52	1.49	1.57	1.53	0.03
1.1PT12	1.24	1.22	1.25	1.24	0.01
1.2PT1	2.85	2.87	2.88	2.87	0.01
1.2PT2	2.09	2.09	2.15	2.11	0.03
1.2PT3	1.55	1.50	1.46	1.50	0.03
1.3PT1	1.05	1.12	1.12	1.10	0.03
1.3PT2	1.46	1.47	1.47	1.47	0.00
1.4PT1	1.09	1.16	1.17	1.14	0.03
1.4PT2	1.08	1.12	1.10	1.10	0.01

1.3 เอนไซม์โปรตีเอส (ต่อ)

Isolates	Halo : colony ratios			Mean	SD
	R1	R2	R3		
1.4PT4	1.39	1.39	1.38	1.39	0.00
1.4PT6	1.30	1.34	1.31	1.32	0.02
1.4PT7	1.23	1.26	1.25	1.25	0.01
1.4PT8	1.57	1.59	1.63	1.60	0.02
1.4PT9	1.64	1.74	1.73	1.70	0.04
2.1PT1	1.31	1.29	1.29	1.30	0.01
2.1PT2	1.10	1.07	1.12	1.10	0.02
2.1PT3	1.85	1.96	1.89	1.90	0.04
2.2PT1	2.10	2.15	1.19	1.81	0.42
2.2PT2	1.47	1.39	1.40	1.42	0.03
2.2PT3	2.39	2.41	2.41	2.40	0.01
2.3PT3	2.47	2.52	2.48	2.49	0.02
2.3PT5	1.20	1.17	1.19	1.19	0.01
2.4PT1	2.74	2.81	2.85	2.80	0.04
2.4PT2	1.44	1.41	1.43	1.43	0.01
3.1PT1	1.33	1.35	1.23	1.30	0.05

1.3 เอนไซม์โปรตีเอส (ต่อ)

Isolates	Halo : colony ratios			Mean	SD
	R1	R2	R3		
3.1PT3	1.42	1.53	1.55	1.50	0.05
3.2PT1	1.29	1.26	1.35	1.30	0.03
3.3PT1	1.69	1.68	1.73	1.70	0.02
3.5PT2	1.06	1.08	1.15	1.10	0.04
3.5PT7	1.22	1.16	1.22	1.20	0.03
3.5PT10	1.13	1.13	1.18	1.15	0.02
3.6PT2	1.71	1.75	1.66	1.71	0.03
3.6PT7	1.89	1.83	2.27	2.00	0.18
3.6PT8	2.61	2.59	2.60	2.60	0.01

1.4 เอนไซม์ไลเปส

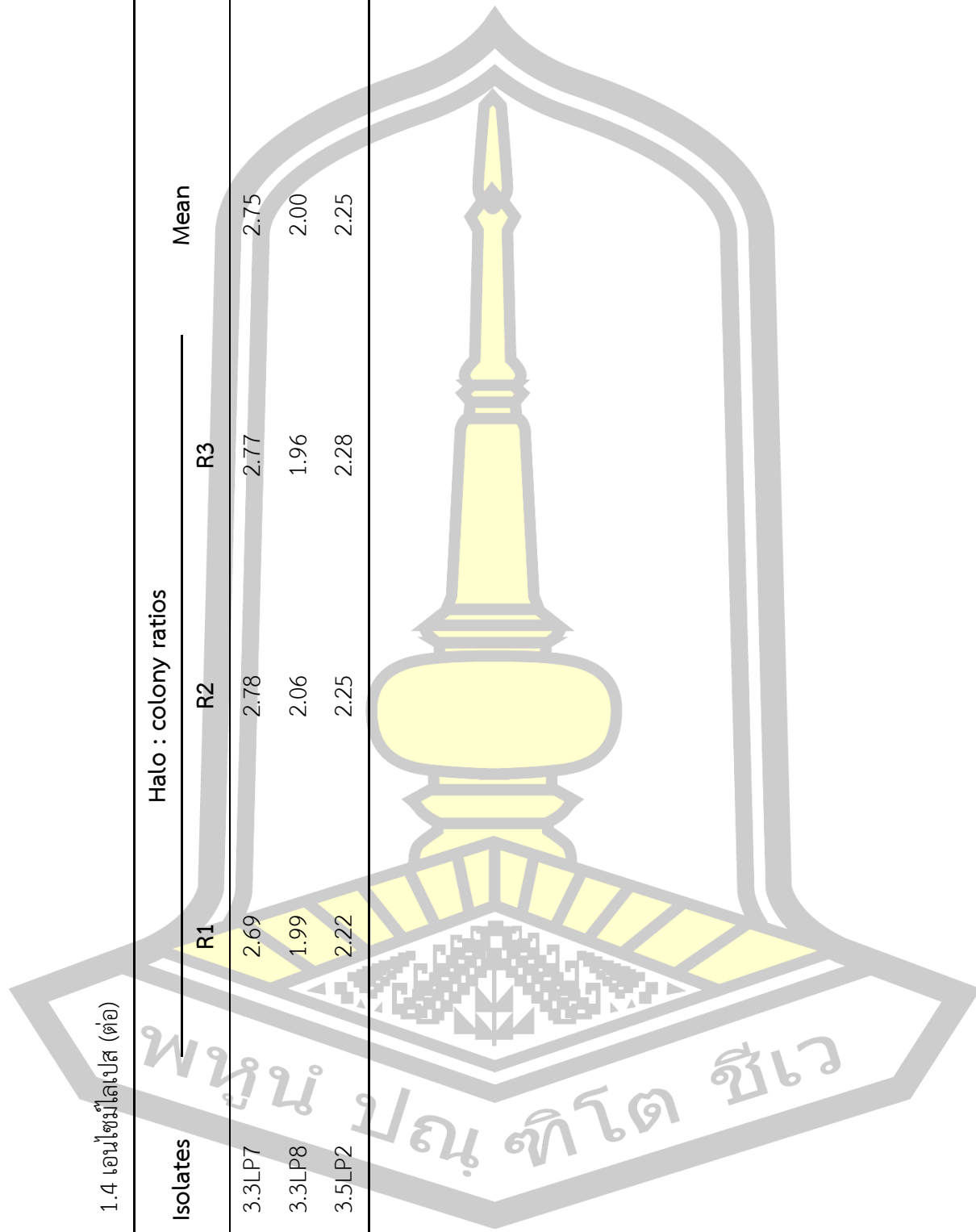
Isolates	Halo : colony ratios			Mean	SD
	R1	R2	R3		
1.1LP1	1.62	1.59	1.59	1.60	0.01
1.1LP2	1.10	1.14	1.17	1.14	0.02
1.1LP3	2.20	2.24	2.30	2.25	0.04
1.1LP4	1.11	1.15	1.05	1.10	0.04
1.1LP5	1.33	1.32	1.24	1.30	0.04
1.2LP1	1.07	1.16	1.08	1.10	0.04
1.2LP2	2.07	1.95	1.99	2.00	0.04
1.2LP3	1.08	1.14	1.08	1.10	0.03
1.2LP4	2.37	2.28	2.33	2.33	0.03
1.3LP1	1.53	1.55	1.43	1.50	0.05
1.3LP2	2.57	2.60	2.62	2.60	0.02
1.3LP6	1.29	1.19	1.27	1.25	0.04
1.3LP7	1.89	1.99	2.12	2.00	0.08
1.3LP9	2.63	2.65	2.73	2.67	0.04
1.4LP3	3.02	2.98	3.00	3.00	0.01
1.4LP4	2.46	2.51	2.52	2.50	0.02

1.4 เอนไซม์ไลเปส (ต่อ)

Isolates	Halo : colony ratios			Mean	SD
	R1	R2	R3		
1.4LP6	1.37	1.39	1.44	1.40	0.03
1.4LP7	2.35	2.31	2.24	2.30	0.04
1.4LP8	2.00	1.96	2.05	2.00	0.03
1.4LP11	1.21	1.18	1.20	1.20	0.01
1.4LP12	1.19	1.23	1.19	1.20	0.02
2.1LP1	1.05	1.17	1.08	1.10	0.05
2.1LP3	1.68	1.65	1.67	1.67	0.01
2.1LP4	3.34	3.27	3.37	3.33	0.04
2.1LP5	1.29	1.29	1.33	1.30	0.02
2.4LP1	2.16	2.21	2.04	2.14	0.06
3.2LP2	2.57	2.54	2.68	2.60	0.06
3.2LP3	1.98	2.02	1.99	2.00	0.02
3.2LP5	1.66	1.64	1.68	1.66	0.01
3.3LP1	4.69	4.63	4.69	4.67	0.03
3.3LP4	1.46	1.48	1.38	1.44	0.04
3.3LP5	3.35	3.28	3.37	3.33	0.04

1.4 เอนไซม์ไลเปส (ต่อ)

Isolates	Halo : colony ratios			Mean	SD
	R1	R2	R3		
3.3LP7	2.69	2.78	2.77	2.75	0.04
3.3LP8	1.99	2.06	1.96	2.00	0.04
3.5LP2	2.22	2.25	2.28	2.25	0.02



2. กิจกรรมเอนไซม์ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลติก

2.1 กิจกรรมเอนไซม์ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส 3 สายพันธุ์ หลังบ่มเป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส



Descriptive Statistics

Dependent Variable: Cellulase activity (U/mL)

Incubation time (h)	strains	Mean	Std. Deviation	N
24.00	<i>Bacillus subtilis</i> 1.2CL2	1.3900	.08888	3
	<i>Bacillus licheniformis</i> 1.23CL3	1.4600	.17000	3
	<i>Bacillus licheniformis</i> 1.1CL5	1.6033	.13204	3
	Total	1.4844	.14976	9
48.00	<i>Bacillus subtilis</i> 1.2CL2	.8267	.24090	3
	<i>Bacillus licheniformis</i> 1.23CL3	1.6933	.23756	3
	<i>Bacillus licheniformis</i> 1.1CL5	1.6333	.12503	3
	Total	1.3844	.45629	9
72.00	<i>Bacillus subtilis</i> 1.2CL2	5.3833	.15567	3
	<i>Bacillus licheniformis</i> 1.23CL3	.9567	.09815	3
	<i>Bacillus licheniformis</i> 1.1CL5	3.0633	.11150	3
	Total	3.1344	1.92056	9
Total	<i>Bacillus subtilis</i> 1.2CL2	2.5333	2.15661	9
	<i>Bacillus licheniformis</i> 1.23CL3	1.3700	.36062	9
	<i>Bacillus licheniformis</i> 1.1CL5	2.1000	.73045	9
	Total	2.0011	1.36914	27



Cellulase activity (U/mL)

Duncan^{a,b}

Incubation time (h)	N	Subset	
		1	2
48.00	9	1.3844	
24.00	9	1.4844	
72.00	9		3.1344
Sig.		.202	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .026.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.

b. Alpha = .05.



Cellulase activity (U/mL)

Duncan^{a,b}

strains	N	Subset		
		1	2	3
<i>Bacillus licheniformis</i> 1.23CL3	9	1.3700		
<i>Bacillus licheniformis</i> 1.1CL5	9		2.1000	
<i>Bacillus subtilis</i> 1.2CL2	9			2.5333
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .026.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.

b. Alpha = .05.



2.1.1 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสของ *Bacillus subtilis* 1.2CL2 ที่สภาวะเหมาะสมเป็น
เวลา 30 นาที

2.1.1.1 pH



Descriptives

Cellulase activity (U/mL)

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					3.00	3		
4.00	3	3.7100	.01732	.01000	3.6670	3.7530	3.70	3.73
5.00	3	4.2300	.02646	.01528	4.1643	4.2957	4.20	4.25
6.00	3	4.3500	.03606	.02082	4.2604	4.4396	4.32	4.39
7.00	3	4.3033	.05686	.03283	4.1621	4.4446	4.24	4.35
8.00	3	3.4033	.02887	.01667	3.3316	3.4750	3.37	3.42
9.00	3	3.2767	.01155	.00667	3.2480	3.3054	3.27	3.29
10.00	3	2.8967	.01155	.00667	2.8680	2.9254	2.89	2.91
Total	24	3.5225	.77370	.15793	3.1958	3.8492	1.97	4.39

Descriptives

Cellulase activity (U/mL)

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					3.00	3		
4.00	3	3.7100	.01732	.01000	3.6670	3.7530	3.70	3.73
5.00	3	4.2300	.02646	.01528	4.1643	4.2957	4.20	4.25
6.00	3	4.3500	.03606	.02082	4.2604	4.4396	4.32	4.39
7.00	3	4.3033	.05686	.03283	4.1621	4.4446	4.24	4.35
8.00	3	3.4033	.02887	.01667	3.3316	3.4750	3.37	3.42
9.00	3	3.2767	.01155	.00667	3.2480	3.3054	3.27	3.29
10.00	3	2.8967	.01155	.00667	2.8680	2.9254	2.89	2.91
Total	24	3.5225	.77370	.15793	3.1958	3.8492	1.97	4.39

2.1.1.2 อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)

Descriptives

Cellulase activity (U/mL)

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					4.00	3		
25.00	3	4.6973	.01102	.00636	4.6700	4.7247	4.69	4.71
35.00	3	5.4017	.01893	.01093	5.3546	5.4487	5.38	5.42
45.00	3	4.4403	.06229	.03596	4.2856	4.5951	4.39	4.51
55.00	3	4.0433	.13796	.07965	3.7006	4.3860	3.94	4.20
65.00	3	3.6267	.00577	.00333	3.6123	3.6410	3.62	3.63
75.00	3	3.3250	.03041	.01756	3.2494	3.4006	3.31	3.36
85.00	3	3.7037	.03004	.01734	3.6290	3.7783	3.67	3.72
95.00	3	3.4313	.03355	.01937	3.3480	3.5147	3.41	3.47
Total	27	4.0124	.67769	.13042	3.7444	4.2805	3.31	5.42

Cellulase activity (U/mL)

Duncan^a

Temperature	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
75.00	3	3.3250						
95.00	3		3.4313					
4.00	3		3.4427					
65.00	3			3.6267				
85.00	3			3.7037				
55.00	3				4.0433			
45.00	3					4.4403		
25.00	3						4.6973	
35.00	3							5.4017
Sig.		1.000	.803	.103	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

2.2 กิจกรรมเอนไซม์ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส 3 สายพันธุ์ หลังบ่มเป็นเวลา 24
48 และ 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Amylase activity (U/mL)

Incubation time (h)	strains	Mean	Std. Deviation	N
24.00	<i>Bacillus cereus</i> 1.4AL3	23.4833	7.22378	3
	<i>Bacillus thuringiensis</i> 3.4AL4	27.3733	2.71150	3
	<i>Bacillus cereus</i> 3.5AL3	17.0700	1.39366	3
	Total	22.6422	5.97261	9
48.00	<i>Bacillus cereus</i> 1.4AL3	33.3700	13.75920	3
	<i>Bacillus thuringiensis</i> 3.4AL4	23.7733	1.73466	3
	<i>Bacillus cereus</i> 3.5AL3	27.9500	5.40856	3
	Total	28.3644	8.52988	9
72.00	<i>Bacillus cereus</i> 1.4AL3	26.5133	2.59500	3
	<i>Bacillus thuringiensis</i> 3.4AL4	33.5833	5.52219	3
	<i>Bacillus cereus</i> 3.5AL3	38.9800	3.10527	3
	Total	33.0256	6.40575	9
Total	<i>Bacillus cereus</i> 1.4AL3	27.7889	9.01670	9
	<i>Bacillus thuringiensis</i> 3.4AL4	28.2433	5.35574	9
	<i>Bacillus cereus</i> 3.5AL3	28.0000	10.01098	9
	Total	28.0107	8.04451	27



Amylase activity (U/mL)

Duncan^{a,b}

Incubation time (h)	N	Subset	
		1	2
24.00	9	22.6422	
48.00	9	28.3644	28.3644
72.00	9		33.0256
Sig.		.060	.120

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 36.658.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.

b. Alpha = .05.



Amylase activity (U/mL)

Duncan^{a,b}

strains	N	Subset
		1
<i>Bacillus cereus</i> 1.4AL3	9	27.7889
<i>Bacillus cereus</i> 3.5AL3	9	28.0000
<i>Bacillus thuringiensis</i> 3.4AL4	9	28.2433
Sig.		.882

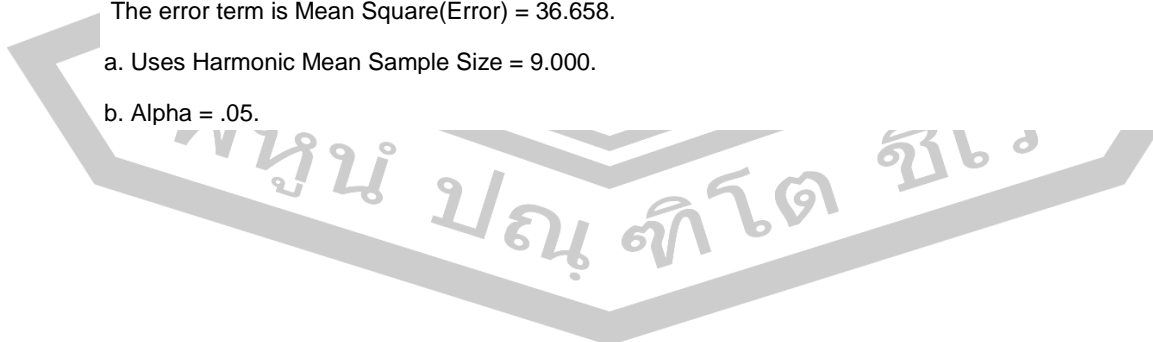
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 36.658.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.

b. Alpha = .05.



2.2.1 กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสของ *Bacillus cereus* 3.5AL3 หลังบ่มที่สภาวะเหมาะสม เป็นเวลา 30 นาที

2.2.1.1 pH

Descriptives

Amylase activity (U/mL)

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					3.00	3		
4.00	3	18.3967	.76265	.44032	16.5021	20.2912	17.60	19.12
5.00	3	25.6000	.94175	.54372	23.2606	27.9394	24.95	26.68
6.00	3	32.4133	1.33095	.76843	29.1071	35.7196	31.44	33.93
7.00	3	35.8400	.33061	.19088	35.0187	36.6613	35.55	36.20
8.00	3	12.8433	1.56148	.90152	8.9644	16.7223	11.11	14.14
9.00	3	8.3033	.21502	.12414	7.7692	8.8375	8.09	8.52
10.00	3	3.6933	.87757	.50667	1.5133	5.8733	2.68	4.20
Total	24	17.8863	11.74613	2.39767	12.9263	22.8462	2.68	36.20

Amylase activity (U/mL)

Duncan^a

pH	N	Subset for alpha = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
10.00	3	3.6933							
3.00	3		6.0000						
9.00	3			8.3033					
8.00	3				12.8433				
4.00	3					18.3967			
5.00	3						25.6000		
6.00	3							32.4133	
7.00	3								35.8400
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

2.2.1.2 อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)

Descriptives

Amylase activity (U/mL)

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					4.00	3		
25.00	3	12.4133	.21502	.12414	11.8792	12.9475	12.20	12.63
35.00	3	19.1167	.43501	.25115	18.0360	20.1973	18.68	19.55
45.00	3	21.1333	.12702	.07333	20.8178	21.4489	21.06	21.28
55.00	3	45.2800	21.65219	12.50090	-8.5070	99.0670	22.36	65.39
65.00	3	47.1533	.81794	.47224	45.1214	49.1852	46.58	48.09
75.00	3	28.1967	10.35861	5.98055	2.4644	53.9289	18.68	39.23
85.00	3	12.1967	.21502	.12414	11.6625	12.7308	11.98	12.41
95.00	3	7.9400	2.68693	1.55130	1.2653	14.6147	4.84	9.60
Total	27	22.4130	15.87472	3.05509	16.1331	28.6928	4.84	65.39

Amylase activity (U/mL)

Duncan^a

Temperature	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
95.00	3	7.9400		
4.00	3	8.2867		
85.00	3	12.1967		
25.00	3	12.4133		
35.00	3	19.1167	19.1167	
45.00	3	21.1333	21.1333	
75.00	3		28.1967	
55.00	3			45.2800
65.00	3			47.1533
Sig.		.090	.207	.779

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

2.3 กิจกรรมเอนไซม์ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอส 3 สายพันธุ์ หลังบ่มเป็นเวลา 24
48 และ 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

Descriptive Statistics

Incubationtime (h)	Strains	Mean	Std. Deviation	N
24.00	<i>Bacillus thuringiensis</i> 1.2PT1	1.9700	.08718	3
	<i>Bacillus cereus</i> 2.1PT3	1.9500	.08888	3
	<i>Bacillus thuringiensis</i> 2.3PT3	1.3533	.07767	3
	Total	1.7578	.31220	9
48.00	<i>Bacillus thuringiensis</i> 1.2PT1	1.4733	.09018	3
	<i>Bacillus cereus</i> 2.1PT3	1.5033	.04933	3
	<i>Bacillus thuringiensis</i> 2.3PT3	1.9133	.02082	3
	Total	1.6300	.21926	9
72.00	<i>Bacillus thuringiensis</i> 1.2PT1	1.7667	.04619	3
	<i>Bacillus cereus</i> 2.1PT3	1.2167	.01528	3
	<i>Bacillus thuringiensis</i> 2.3PT3	2.0967	.10693	3
	Total	1.6933	.38945	9
Total	<i>Bacillus thuringiensis</i> 1.2PT1	1.7367	.22633	9
	<i>Bacillus cereus</i> 2.1PT3	1.5567	.32415	9
	<i>Bacillus thuringiensis</i> 2.3PT3	1.7878	.34197	9
	Total	1.6937	.30705	27



Protease activity (U/mL)

Duncan^{a,b}

Strains	N	Subset	
		1	2
Bacillus cereus 2.1PT3	9	1.5567	
Bacillus thuringiensis 1.2PT1	9		1.7367
Bacillus thuringiensis 2.3PT3	9		1.7878
Sig.		1.000	.148

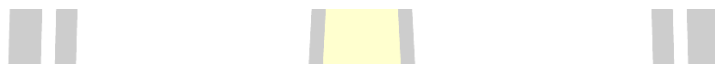
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .005.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.

b. Alpha = .05.



Protease activity (U/mL)

Duncan^{a,b}

Incubationtime (h)	N	Subset	
		1	2
48.00	9	1.6300	
72.00	9	1.6933	1.6933
24.00	9		1.7578
Sig.		.077	.073

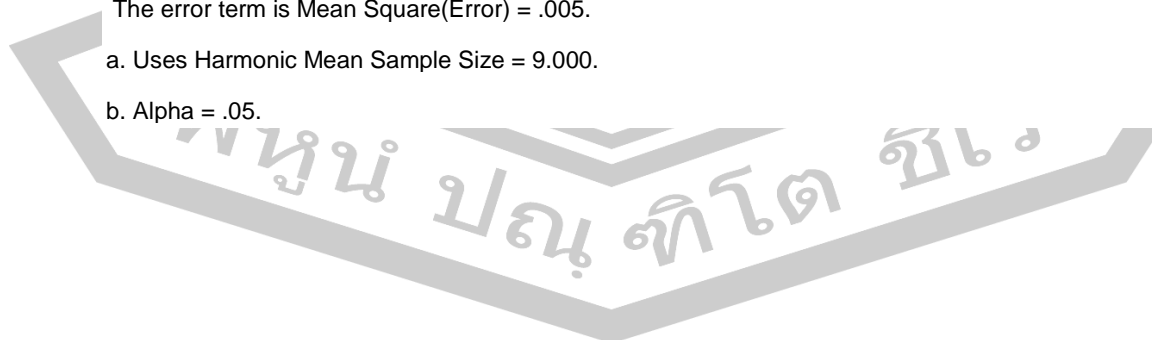
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .005.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.

b. Alpha = .05.



2.3.1 กิจกรรมเอนไซม์โปรตีเอสของ *Bacillus thuringiensis* 2.3PT3 หลังบ่มที่สภาวะ
เหมาะสมเป็นเวลา 30 นาที

2.3.1.1 pH

Descriptives

Protease activity (U/mL)

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					3.00	3		
4.00	3	2.8833	.23288	.13445	2.3048	3.4618	2.72	3.15
5.00	3	3.0233	.02309	.01333	2.9660	3.0807	3.01	3.05
6.00	3	2.9167	.18930	.10929	2.4464	3.3869	2.70	3.05
7.00	3	4.2200	.25981	.15000	3.5746	4.8654	4.07	4.52
8.00	3	6.4400	.03464	.02000	6.3539	6.5261	6.42	6.48
9.00	3	1.4633	.09074	.05239	1.2379	1.6887	1.38	1.56
10.00	3	.6967	.06028	.03480	.5469	.8464	.64	.76
Total	24	3.0296	1.66614	.34010	2.3260	3.7331	.64	6.48

Protease activity (U/mL)

Duncan^a

pH	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
10.00	3	.6967					
9.00	3		1.4633				
3.00	3			2.5933			
4.00	3				2.8833		
6.00	3				2.9167		
5.00	3				3.0233		
7.00	3					4.2200	
8.00	3						6.4400
Sig.		1.000	1.000	1.000	.284	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

2.3.1.2 อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)

Descriptives

Protease activity (U/mL)

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					4.00	3		
25.00	3	1.1770	.07508	.04335	.9905	1.3635	1.10	1.25
35.00	3	1.6177	.05713	.03299	1.4757	1.7596	1.55	1.66
45.00	3	3.3577	.04067	.02348	3.2566	3.4587	3.32	3.40
55.00	3	3.6013	.09349	.05398	3.3691	3.8336	3.50	3.69
65.00	3	8.8600	.26154	.15100	8.2103	9.5097	8.71	9.16
75.00	3	3.4543	.05082	.02934	3.3281	3.5806	3.40	3.49
85.00	3	.4193	.09394	.05424	.1860	.6527	.33	.52
95.00	3	.3223	.08079	.04664	.1217	.5230	.23	.38
Total	27	2.6050	2.59592	.49958	1.5781	3.6319	.23	9.16

Protease activity (U/mL)

Duncan^a

Temperature	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
95.00	3	.3223					
85.00	3	.4193	.4193				
4.00	3		.6353				
25.00	3			1.1770			
35.00	3				1.6177		
45.00	3					3.3577	
75.00	3					3.4543	
55.00	3					3.6013	
65.00	3						8.8600
Sig.		.404	.073	1.000	1.000	.056	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

2.4 กิจกรรมเอนไซม์ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส 3 สายพันธุ์ หลังบ่มเป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

Descriptive Statistics

Dependent Variable:Liapse activity (U/mL)

Incubation time (h)	Strains	Mean	Std. Deviation	N
24.00	Bacterium 1.1LP1	38.2300	2.85379	3
	Bacillus licheniformis 1.2LP1	42.9633	1.37409	3
	Bacillus subtilis 1.3LP2	41.7733	4.85459	3
	Total	40.9889	3.59816	9
48.00	Bacterium 1.1LP1	43.7600	1.82321	3
	Bacillus licheniformis 1.2LP1	55.7400	.79674	3
	Bacillus subtilis 1.3LP2	42.7667	1.03346	3
	Total	47.4222	6.35284	9
72.00	Bacterium 1.1LP1	74.5400	2.75396	3
	Bacillus licheniformis 1.2LP1	93.4000	8.27464	3
	Bacillus subtilis 1.3LP2	97.7733	2.41332	3
	Total	88.5711	11.61018	9
Total	Bacterium 1.1LP1	52.1767	17.08256	9
	Bacillus licheniformis 1.2LP1	64.0344	23.09589	9
	Bacillus subtilis 1.3LP2	60.7711	27.89184	9
	Total	58.9941	22.78737	27



Liapse activity (U/mL)

Duncan^{a,b}

Incubation time (h)	N	Subset		
		1	2	3
24.00	9	40.9889		
48.00	9		47.4222	
72.00	9			88.5711
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 13.389.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.

b. Alpha = .05.



Liapse activity (U/mL)

Duncan^{a,b}

Strains	N	Subset	
		1	2
Bacterium 1.1LP1	9	52.1767	
Bacillus subtilis 1.3LP2	9		60.7711
Bacillus licheniformis 1.2LP1	9		64.0344
Sig.		1.000	.075

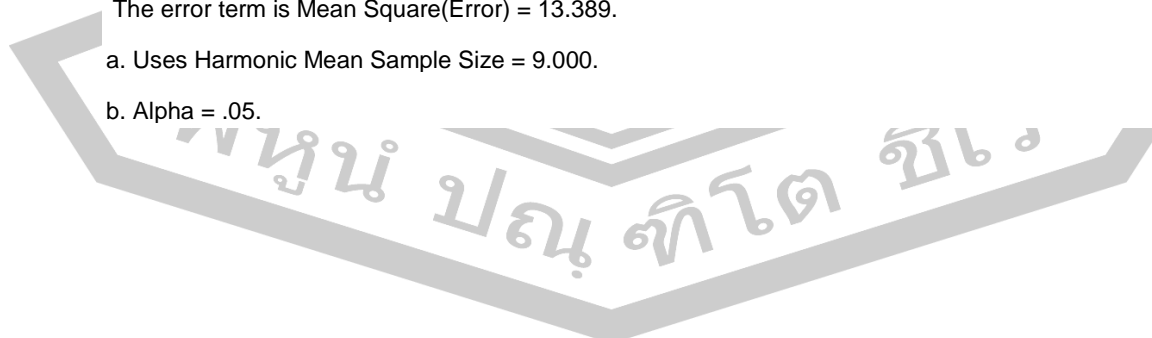
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 13.389.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.

b. Alpha = .05.



2.4.1 กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของ *Bacillus subtilis* 1.3LP2 หลังบ่มที่สภาวะ
เหมาะสมเป็นเวลา 30 นาที

2.4.1.1 pH

Descriptives

Lipase activity (U/mL)

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					3.00	3		
4.00	3	15.3700	2.59813	1.50003	8.9159	21.8241	13.58	18.35
5.00	3	34.4333	2.14808	1.24019	29.0972	39.7695	32.05	36.22
6.00	3	86.6567	1.49938	.86567	82.9320	90.3813	85.07	88.05
7.00	3	105.1233	12.03363	6.94762	75.2301	135.0165	92.22	116.04
8.00	3	56.6700	2.40755	1.39000	50.6893	62.6507	55.28	59.45
9.00	3	51.8400	2.39643	1.38358	45.8869	57.7931	49.32	54.09
10.00	3	45.1533	1.19500	.68994	42.1848	48.1219	43.96	46.35
Total	24	49.8625	32.62342	6.65923	36.0868	63.6382	1.67	116.04

Lipase activity (U/mL)

Duncan^a

pH	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
3.00	3	3.6533						
4.00	3		15.3700					
5.00	3			34.4333				
10.00	3				45.1533			
9.00	3				51.8400	51.8400		
8.00	3					56.6700		
6.00	3						86.6567	
7.00	3							105.1233
Sig.		1.000	1.000	1.000	.099	.224	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

2.4.1.2 อุดหนุน (องศาเซลเซียส)

Descriptives

Lipase activity (U/mL)

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					4.00	3		
25.00	3	20.1333	2.72882	1.57548	13.3546	26.9121	17.75	23.11
35.00	3	34.2333	2.99941	1.73171	26.7824	41.6843	31.45	37.41
45.00	3	97.5767	.59501	.34353	96.0986	99.0547	96.98	98.17
55.00	3	160.9200	.90670	.52348	158.6676	163.1724	160.13	161.91
65.00	3	140.0700	.90670	.52348	137.8176	142.3224	139.28	141.06
75.00	3	105.7200	.90670	.52348	103.4676	107.9724	104.73	106.51
85.00	3	87.6467	2.48279	1.43344	81.4791	93.8143	85.66	90.43
95.00	3	28.0767	1.23779	.71464	25.0018	31.1515	26.69	29.07
Total	27	75.6237	53.54601	10.30494	54.4416	96.8058	4.65	161.91

Lipase activity (U/mL)

Duncan^a

Temperature	N	Subset for alpha = 0.05								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
4.00	3	6.2367								
25.00	3		20.1333							
95.00	3			28.0767						
35.00	3				34.2333					
85.00	3					87.6467				
45.00	3						97.5767			
75.00	3							105.7200		
65.00	3								140.0700	
55.00	3									160.9200
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวมนัสชนก โยชน์ชัยสาร
วันเกิด	วันที่ 28 มีนาคม พ.ศ. 2537
สถานที่เกิด	อำเภอเมืองมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 17/1 ถนนจุฬาราม ตำบลตลาด อำเภอเมืองมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม รหัสไปรษณีย์ 44000
ตำแหน่งหน้าที่การงาน	นิสิตปริญญาโท
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ตำบลขามเรียง อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม รหัสไปรษณีย์ 44150
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2554 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนสารคามพิทยาคม อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม พ.ศ. 2559 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม พ.ศ. 2562 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
ทุนวิจัย	โครงการพัฒนาศักยภาพบุคลากร STEM (Science, Technology Engineering, and Mathematics) เพื่อการวิจัยและพัฒนาสำหรับภาคอุตสาหกรรม ภายใต้การสนับสนุนของสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ทุนอุดหนุนการทำกิจกรรมส่งเสริมและสนับสนุนการทำวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2561 ภายใต้สนับสนุนของสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

พูน ปณ ทัโต ชีเว